

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**SOBREEXPRESIÓN DEL GEN NTRC EN TABACO (*Nicotiana
tabacum*) MEDIANTE TRANSFORMACIÓN PLASTIDIAL**

Presentado por

JAVIER MAULEÓN BURGOS

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA
*NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO BARATZEZAINZA, FRUTAGINTZA ETA
LOREZAINZA BEREZITASUNA***

Noviembre, 2011

RESUMEN

El tabaco es la única planta superior en la que se realiza la transformación plastidial de forma rutinaria y es por tanto un referente en esta técnica. El Grupo de Investigación de Agrobiotecnología Vegetal (CSIC-UPNA) lleva un tiempo utilizando este sistema para sobreexpresar plastidialmente diferentes tipos de tiorredoxinas.

En el año 2004 se describió el gen NTRC, que codifica una proteína con un dominio tiorredoxina y un dominio NTR (NADP tiorredoxina reductasa). Hasta la fecha, no se ha analizado la sobreexpresión de este gen en plantas superiores.

El objetivo de este trabajo fin de carrera ha sido sobreexpresar plastidialmente el gen NTRC en tabaco. Para ello, se ha utilizado el método biolístico de transformación y se ha ensayado en paralelo la utilización de dos promotores distintos en la regulación del transgén. Por un lado se ha utilizado el promotor fotoinducible del gen *psbA* y por otro el promotor constitutivo del gen ribosomal 16S.

Se ha logrado obtener plantas transplastómicas de tabaco que sobreexpresan el gen NTRC bajo el control de los dos promotores. Sin embargo, todas las líneas transformadas obtenidas han resultado ser heteroplásmicas.

Pamplona, Noviembre del 2011.

VºBº del Director

El alumno

Luis M. Larraya Reta

Javier Mauleón Burgos

*A todos los componentes del grupo de
Agrobiotecnología Vegetal, por permitirme
compartir e instruirme en sus actividades.
Especial mención a Luis Larraya por su
paciencia y dedicación.*

Gracias

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
1. Plantas Transgénicas	2
1.1 Concepto	2
1.2 Principales Utilidades	2
1.2.1 Mejora Agronómica de los Cultivos	3
1.2.2 Utilización como Biorreactores	4
1.3 El Tabaco como Referente de la Modificación Genética	5
2. Tipos de Modificación Genética	6
2.1 Transformación Nuclear	6
2.2 Transformación Plastidial	7
2.3 Ventajas e Inconvenientes de la Transformación Plastidial frente a la Nuclear	9
2.3.1 Ventajas	9
2.3.2 Inconvenientes	11
3. Principales Agentes de la Transformación Plastidial	12
3.1 Plastidios	12
3.2 Bombardeo de Micropartículas (Biolística)	14
3.3 Vectores de Transformación	17
3.3.1 Secuencias Flanqueantes	17
3.3.2 Promotores y Elementos Regulatorios	18
3.3.3 Gen Marcador de Selección	19
4. Oxidorreductasas	21
4.1 Tiorredoxinas (Trx)	21
4.2 Tiorredoxina Reductasas	23
4.2.1 Sistema NADPH Tiorredoxina Reductasa (NTR)	23
4.2.2 Sistema Ferredoxina Tiorredoxina Reductasa (FTR)	24
4.3 NADPH Tiorredoxina Reductasa Cloroplástica (NTRC)	25
ANTECEDENTES	28
OBJETIVOS	30
MATERIAL Y MÉTODOS	32
1. Cultivo <i>in vitro</i> del Material Vegetal	32
1.1 Material Vegetal	32
1.2 Medios de Cultivo	32
1.2.1 Medio P3	32
1.2.2 Medio RMOP	33

1.3 Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	34
2. Transformación Plastidial	35
2.1 Preparación del Material.....	35
2.1.1 Material Vegetal	35
2.1.2 Vector.....	35
2.1.3 Projectiles.....	37
2.2 Bombardeo	37
2.3 Obtención de Regenerantes.....	38
2.3.1 Primera Ronda de Selección	38
2.3.2 Segunda Ronda de Selección	39
2.3.3 Subcultivo de Brotes	39
3. Análisis de los Regenerantes	40
3.1 Extracción del ADN. Método CTAB	40
3.2 Cuantificación ADN	41
3.3 Análisis Southern Blot	41
RESULTADOS	48
1. Bombardeo con el Vector pAF PpsbA NTRC	48
2. Bombardeo con el Vector pAF PrnG10L NTR	54
DISCUSIÓN	59
1. Obtención de Regenerantes	59
2. Mutaciones Espontáneas	60
3. Heteroplasma	61
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	65

INTRODUCCIÓN

1. Plantas Transgénicas

1.1 Concepto

Las plantas transgénicas son organismos genéticamente modificados a cuyos genomas se les ha introducido uno o más genes exógenos. El origen de estos genes puede ser muy diverso, lo que permite introducir en una especie características de otras especies distintas. Sin embargo, la modificación genética de un organismo no se limita únicamente a la inclusión de genes de otras especies, de hecho se puede sobreexpresar un gen ya presente en la especie o incluso suprimir determinados genes (delección). La delección de uno o varios genes de un genoma es usado como medio para el estudio de rutas metabólicas y funciones del gen suprimido en el organismo, mientras que la sobreexpresión busca incrementar la síntesis proteica. La expresión del transgén puede ser permanente o transitoria, en función de si el transgén queda o no integrado en el genoma receptor. Por norma, para la síntesis de proteínas recombinantes es conveniente la expresión permanente; siendo la expresión transitoria empleada para evaluar la eficiencia de la transferencia directa del ADN (generalmente junto a un gen reportero como *gusA* o *gfp*).

1.2 Principales Utilidades

En 1983, 4 grupos independientes publicaron las investigaciones en las que se introducían genes foráneos en células vegetales (Murai et al., 1983; Bevan et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983; Fraley et al., 1983), habían creado las primeras plantas transgénicas. Actualmente, las principales utilidades de las plantas transgénicas pueden clasificarse en dos apartados: la mejora agronómica de los cultivos y su utilización como biorreactores.

1.2.1 Mejora Agronómica de los Cultivos

En 1996 se comercializó la primera planta transgénica apta para cultivo. Desde entonces el crecimiento de la superficie cultivada y el número de países cultivadores no ha cesado. Según un estudio realizado por el Servicio Internacional para la Adquisición de las Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), en 1996 solo 6 países cultivaban 1,7 millones de hectáreas de transgénicos, ya en 2006 el número de países ascendió a 22 con un total de 102 millones de hectáreas; 60 veces más. Este incremento de la superficie cultivada con plantas transgénicas se debe a la estabilidad y sustentabilidad de la producción, resumiendo, más beneficios en proporción a la superficie cultivada. En los cultivos de campo la mayoría de plantas transgénicas proporcionan resistencia a insectos o a herbicidas, entre los 4 cultivos transgénicos más cultivados destacan: soja, maíz, algodón y colza (Clive 2003).

La superficie mundial dedicada al cultivo roza su máxima utilización, se prevé que poco se pueda incrementar; además, la población mundial estimada es de 9,2 mil millones para el 2050 (Datos de la FAO sept. 2009). También los cambios climáticos por el progresivo calentamiento global, pueden suponer un problema en cuanto a la producción de alimentos. Se afronta esta problemática como un desafío biotecnológico, que puede ser solventado con la aplicación de la ingeniería genética en plantas (Clarke & Daniell 2011).

Las ventajas de las plantas modificadas genéticamente engloban todas las alteraciones que permitan obtener mayores rendimientos de los cultivos, menor uso de químicos y poder mitigar las acciones del cambio climático sobre el desarrollo vegetal. Estas son: resistencias a insectos, herbicidas y enfermedades virales, mejorar la calidad nutritiva de los alimentos, tolerancia al estrés ambiental, producción de frutos más resistentes, fijación de nitrógeno y síntesis de lípidos para la producción de biocombustibles.

Sin embargo, no todo son ventajas en el uso de plantas modificadas genéticamente. Existen ciertos riesgos e inconvenientes que a pesar de que muchos de ellos pueden ser solventados con la tecnología actual, provocan un fuerte rechazo

social. Este rechazo social, en cierta medida, ha promovido una legislación que impide o dificulta el cultivo en ciertas regiones, como por ejemplo Europa (Park et al., 2011).

Uno de los mayores riesgos es la transferencia o escape de los transgenes a variedades no transformadas o incluso a individuos silvestres. La transferencia de genes foráneos se da vía polen generalmente y en algunas especies cultivadas puede llegar a ser muy alta, como se ha visto en fresa y en girasol (Daniell 1999). Sin embargo, se han desarrollado diversos métodos para frenar esta transmisión: androesterilidad, semillas sin capacidad de germinación, cleistogamia, apomixia, incompatibilidad genética y control mediante promotores inducibles (Daniell 2002).

1.2.2 Utilización como Biorreactores

La producción de proteínas recombinantes en plantas se ha consolidado como una alternativa prometedora en los últimos años.

Tradicionalmente la producción comercial de proteínas se ha realizado en fermentadores microbianos (Levaduras y *E. coli* generalmente) y en células de mamíferos. Estos sistemas de producción se muestran en desventaja frente al uso de las plantas como biorreactores en costes variables, grandes producciones y seguridad biológica (Knäblein & Schering 2005). La producción de proteínas recombinantes en plantas está fundamentada en la reducción de costes en la producción. Sin embargo, los bajos costes de la producción de estas proteínas dependen directamente de los niveles de expresión, ya que la tecnología para el cultivo y el procesamiento a gran escala ya están desarrollados. La mayor debilidad del empleo de las plantas como biorreactores es la falta de conocimiento en los procesos involucrados en la estabilidad, extracción y purificación de las proteínas (Obembe et al., 2010). De las proteínas recombinantes que se producen, las que suscitan más interés económico son las de uso terapéutico. Se encuentran entre las proteínas producidas a nivel industrial: vacunas, anticuerpos, hormonas, proteínas sanguíneas y enzimas (Fischer & Emans 2000).

1.3 El Tabaco como Referente de la Modificación Genética

La primera transformación plastidial en tabaco (*Nicotiana tabacum*) se realizó hace 21 años (¹Svab et al., 1990), lo que supone un dilatado desarrollo de la tecnología usada para la transformación y expresión de genes en esta especie. Hasta la fecha se han integrado y expresado transgenes en su plastoma atendiendo a intereses agronómicos (resistencia: Jin et al., 2011; Daniell et al., 1998; Lee et al., 2011, tolerancia: Lee et al., 2003), ecológicos (fitorremediación: Ruiz et al., 2003), como marcadores de selección (Tabla 1.2) o para la producción de proteínas recombinantes (Obembe et al., 2010).

Actualmente el tabaco es la planta superior más empleada en la transformación plastidial. Algunas de las ventajas que muestra el tabaco son: la gran producción de biomasa, la facilidad para el cultivo *in vitro*, alta tasa de recombinación homóloga y cierta facilidad para lograr la homoplasma. Por el contrario, en otras especies la consecución de la homoplasma es un gran lastre para la transformación plastidial, así como la inexistencia de protocolos optimizados en la regeneración a partir de células diferenciadas.

Otra ventaja del empleo del tabaco para la biosíntesis de proteínas recombinantes es que se trata de un cultivo no comestible, por tanto no posee beneficios agroalimentarios y se minimiza el paso de las proteínas recombinantes a la cadena alimenticia. Además no es necesario completar el ciclo vital para su producción (hecho que disminuye el riesgo de polinización cruzada) y tiene gran rendimiento en la producción de biomasa, más de 100 toneladas por hectárea de hoja verde en un año de cultivo. Sin embargo, el tabaco presenta una desventaja como biorreactor, el elevado contenido en nicotina (entre el 2 y 12 % del peso seco) y otros alcaloides tóxicos, que han de eliminarse por completo durante la purificación de proteínas recombinantes.

2. Tipos de Modificación Genética

La información genética en las plantas superiores se encuentra organizada a dos niveles: bien nuclear o bien extranuclear; ya sea esta última en mitocondrias o en plastos. Actualmente, existen dos tipos de modificación genética, la transformación nuclear y la transformación plastidial, en función de que el transgén se inserte en el genoma nuclear o en el plastoma respectivamente.

2.1 Transformación Nuclear

Durante estos últimos 25 años, se han conseguido modificar genéticamente las plantas y otros organismos. Los métodos empleados han sido diversos, así como el rendimiento de la transformación.

El primer método usado eficazmente para la transformación nuclear de plantas fue mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; esta es una bacteria del suelo perteneciente a la familia Rhizobiaceae. La interacción de la bacteria con la planta provoca un intercambio genético, genes presentes en el plásmido *Ti* (inductor de tumores) de la bacteria se transfieren al genoma nuclear de las células vegetales, proliferando éstas y formando tumores de la agalla de la corona. La transformación con *Agrobacterium* se logró a principios de la década de los 80, se obtuvieron plantas transgénicas satisfactoriamente en solanáceas; especialmente en tabaco (De Block et al., 1984).

Una vez lograda la primera transformación nuclear se fueron consiguiendo éxitos con diferentes métodos: la electoporación (Shillito et al., 1985), microinyección (Crossway et al., 1986), tratamientos con PEG (polietilenglicol), (Negrutiu et al., 1987) o fosfato de calcio y el bombardeo de micropartículas (Sanford et al., 1987). El bombardeo de micropartículas o método biolístico, consiste en acelerar partículas cubiertas de ADN y dispararlas sobre un tejido vegetal. La velocidad de las partículas

ha de ser adecuada para atravesar la pared celular sin causar un daño letal a las células. El ADN una vez en el interior celular puede integrarse en el ADN nuclear.

Actualmente, los sistemas más empleados para la transformación nuclear son el biolístico y el mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema de *Agrobacterium* como método de transformación tiene las ventajas de que se pueden transmitir fragmentos grandes de ADN y se ha logrado la transformación directa *in vivo* sobre *Arabidopsis thaliana*, evitando el cultivo de tejidos. La ventaja del método biolístico es que abarca un rango más amplio de especies.

2.2 Transformación Plastidial

El objeto de la transformación plastidial, como su propio nombre indica son los plastidios; mayoritariamente los cloroplastos, aunque está referenciada la transformación de proplastos por la empresa Monsanto (Langbecker et al., 2004). Para la integración del ADN en el plastoma se requiere superar de forma física varias barreras: la pared celular, el citoplasma y la doble membrana plastidial del cloroplasto. A fecha de hoy, no existe bacteria o virus que pueda integrar la información genética en el plastoma; como ocurre en la transformación nuclear mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los principales métodos para la obtención de líneas estables mediante la transformación plastidial son: el tratamiento con polietilenglicol (PEG) y la aceleración de micropartículas o biolística.

La transformación plastidial vía polietilenglicol es una alternativa al sistema biolístico más laboriosa y menos eficiente. Los tratamientos con PEG requieren de experiencia de la digestión enzimática de la pared celular –para obtener protoplastos– y un posterior tratamiento para la regeneración. El PEG crea poros en la membrana celular por los cuales se adentra el ADN exógeno en el citosol para posteriormente introducirse en el cloroplasto. El otro método más empleado, el biolístico, se basa en la introducción mecánica del ADN portado en los microproyectiles. A fecha de hoy, se discute cómo el ADN foráneo puede ser trasladado desde el citosol al plastoma e integrarse en éste, tanto en la transformación mediada por PEG, como en el biolístico.

Independientemente del método empleado para insertar el ADN foráneo, una vez en el plasto la integración estable en el plastoma se produce gracias a múltiples eventos de recombinación homóloga (Kavanagh et al., 1999). Con esta integración del ADN, se obtiene una célula modificada, en la cual un bajo porcentaje de los plastidios son transformados (estado heteroplásmico). Para llegar a la homoplasma, es necesaria la supresión del genoma plastidial no-modificado, por lo que se realizan varias rondas con una fuerte presión de selección (generalmente con antibióticos). Tras alcanzarse las 20 o 30 divisiones celulares (Maliga 2004) se logra la homoplasma debido a la resistencia concedida por el gen marcador de selección. La transformación plastidial se realiza de forma rutinaria solo sobre dos organismos, uno es el alga unicelular verde *Chlamydomonas* (que posee un único cloroplasto y ocupa aproximadamente un 60% del volumen total de la célula) y el otro Tabaco. Las diferencias entre organismos son patentes a la hora de lograr la homoplasma, se tarda menos en *Chlamydomonas* y más en tabaco debido a la elevada poliploidía del genoma plastidial.

Actualmente las plantas modificadas plastidialmente para su uso en campo, incluyen resistencias a herbicidas o a insectos. La primera demostración del potencial de la transformación plastidial fue en 1995; cuando se expresó la toxina *Cry1A(c)* de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (McBride et al., 1995) llegando a almacenarse hasta un 3-5% de proteínas totales solubles (PTS); más tarde se logró producir niveles de hasta el 46,1% de PTS de la proteína *Cry2Aa2* (De Cosa et al., 2001). En el 2005 comenzaron los primeros ensayos de campo en China e India con líneas transplastomáticas de arroz que incluyen proteínas *Bt* (Altpeter et al 2005).

Las resistencias a herbicidas es otro de los tratamientos agronómicos más estudiados, la sobreexpresión del gen codificante de 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) ofrece resistencia a elevadas dosis de *Glifosato* (Daniell et al., 1998), obteniendo mayores niveles si la expresión es plastidial frente a la nuclear (aprox. un 5 % más) y el transgén *bar*, codificante de Glufosinato de Amonio, ofrece resistencia a *Isoxaflutol* (Iamtham & Day 2000); entre los más relevantes.

Sin embargo, la principal utilización de la transformación plastidial es la producción de proteínas recombinantes o el estudio de rutas metabólicas. La transformación plastidial se usa comercialmente para la síntesis de proteínas

recombinantes a gran escala, especialmente enzimas de interés industrial y proteínas de uso terapéutico.

2.3 Ventajas e Inconvenientes de la Transformación Plastidial frente a la Nuclear

Modificación plastidial o nuclear, como cualquier técnica cada una de ellas posee ventajas e inconvenientes. En los siguientes párrafos, se exponen brevemente algunas de las características de la transformación plastidial, sus ventajas e inconvenientes respecto a características de la transformación nuclear.

2.3.1 Ventajas

- Elevada síntesis de proteínas recombinantes. Una gran ventaja para la síntesis de proteínas recombinantes -en el plasto- es el elevado número de copias genéticas que se pueden obtener del transgén. Se estima que hay unas 10.000 copias de ADN plastidial por cada célula de mesodermo (Benedich 1987). Además la mayoría de las especies poseen en los plastomas las regiones duplicadas invertidas (IR) y se ha visto que por el mecanismo de corrección de copia, si un transgén se introduce en una IR automáticamente se duplica en la otra (Goulding et al., 1996). Por tanto, los genes codificados en estas zonas presentarían 20.000 copias. La expresión del transgén, dada la poliploidía del genoma plastidial, produce una elevada acumulación de proteínas recombinantes, llegando hasta el 70% de PTS (Oey et al., 2009).
- Compartimentalización de la proteína recombinante. Las proteínas sintetizadas son mantenidas en el cloroplasto y no son transportadas a otros compartimentos celulares, lo que evita la toxicidad producida por determinadas proteínas al acumularse en el citoplasma.

- Inserción dirigida del transgén. La zona del plastoma en la que se inserta el transgén puede controlarse con las secuencias flanqueantes. Gracias a la recombinación homóloga el casete de transformación es insertado en la zona de interés a diferencia de la transformación nuclear, donde la zona de inserción del transgén es aleatoria.
- Ausencia de efectos epigénéticos y silenciamiento. El silenciamiento génico suprime la expresión de un gen endógeno, puede ser a nivel transcripcional, modificando histonas o post-transcripcional, suprimiendo el ARN mensajero (Baulcombe 2004). En la transformación plastidial, hasta la fecha, no se han observado efectos epigénéticos ni silenciamiento (Verma et al., 2008), los cuales si se producen en la transformación nuclear.
- Vectores policistronicos. Gracias a la maquinaria procariótica de expresión en los plastidios se puede expresar varios genes simultáneamente con un solo operón.
- Bajo porcentaje de escape de genes en polinización cruzada. El riesgo de biocontaminación o de transmisión de transgenes, de las plantas modificadas genéticamente a las silvestres, es una cuestión muy relevante y extendida que preocupa en la actualidad. Se estima que el ADN plastidial, transmitido vía paterna, en cruzamientos de plantas modificadas con individuos no-transplastomáticos es del orden de 10^{-5} ; es decir una de cada 100.000 polinizaciones (Svab & Maliga, 2007). En contraste, la herencia paterna de transgenes nucleares entre organismos modificados y silvestres es mucho más frecuente. El bajo porcentaje de escape de genes vía polen en la transformación plastidial es porque el plastoma presenta herencia fundamentalmente materna debido a dos causas: i) la mayoría de las especies no presentan plastidios en los granos de polen y ii) en las especies que si los llevan, el plastoma es degradado por no estar protegido por metilación.

2.3.2 Inconvenientes

- Tecnología no rutinaria. La transformación plastidial es actualmente rutinaria únicamente en Tabaco y *Chlamydomonas*. Los principales obstáculos en otras especies (principalmente monocotiledóneas) son: i) la inexistencia de protocolos optimizados de regeneración *in vitro*; ii) ausencia de vectores de transformación eficientes para los diferentes cultivos y iii) la falta de marcadores de selección adecuados (Day & Goldschmidt-Clermont 2011).
- Ausencia de glicosilación. Muchas proteínas necesitan glicosilarse para ser funcionales (Brooks 2004). Este proceso que consiste en la adición de un glúcido, se produce en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. Por ello, la glicosilación no existe en las proteínas sintetizadas en los plastidios, lo que supone una desventaja en la expresión de proteínas de uso terapéutico en los cloroplastos.
- Transferencia de los transgenes. Se puede producir transferencia horizontal entre plastidios y bacterias, debido a la homología que existe entre ambos genomas. También se puede dar transferencia de información genética del plastidio al núcleo. La frecuencia de transferencia es baja, alrededor del 0,006% (Huang et al., 2003) y aun ocurriendo la transferencia de información genética, es complejo que los genes tornasen funcionales debido a la incompatibilidad de las secuencias reguladoras.

3. Principales Agentes de la Transformación Plastidial

3.1 Plastidios

Todos los plastidios provienen de una estructura primigenia llamada proplasto. Los proplastidios carecen de color y de membrana interna. En ausencia de luz, los proplastidios evolucionan hacia etioplastos: cromoplastos o leucoplastos. Los cromoplastos son ricos en carotenoides y se hallan en flores, frutos, raíces y hojas senescentes. Los leucoplastos a su vez se subdividen en amiloplastos, proteoplastos y elaioplastos; que almacenan almidón, proteínas y aceites respectivamente (Gillham 1994).

En presencia de luz los proplastidios evolucionan a cloroplastos, presentes en tejidos verdes. Los cloroplastos son los encargados de realizar la fotosíntesis y suministrar la energía primaria en forma de ATP. En una célula del mesófilo de una hoja adulta de tabaco, hay aproximadamente 100 cloroplastos.

Los plastos poseen su propia información genética, altamente poliploide. La información está contenida en una doble cadena circular de ADN (ADN_{pt}) con una extensión de 120 a 180kb que codifica unos 120 genes. Esta molécula presenta varias copias agrupadas en clusters unidos a membranas llamados nucleoides, habiendo varios nucleoides por plastidio.

En cuanto al origen y evolución del genoma plastidial, hoy en día está extendido y aceptado el origen procariota y la teoría de la endosimbiosis (Gould et al. 2008). No obstante, el plastoma se ha reducido en tamaño desde su origen, solo un 5% de los genes que constituían la cianobacteria ancestral permanecen hoy día en el plastoma. El resto de genes han sido transferidos al núcleo durante la coevolución y son post-transcripcionalmente importados al plastidio.

Concretamente en tabaco, el plastoma tiene 155.939 bp y codifica 146 genes. La secuenciación completa del plastoma del tabaco (Figura 1.1) fue publicada en 1986 (Shinozaki et al., 1986) y posteriormente actualizada en 1998 (Wakasugi et al., 1998). En el genoma del cloroplasto se pueden diferenciar 3 partes: dos regiones sin repetir,

una larga (LSC, Long Single Copy) y otra corta (SSC, Short Single Copy) de 86.686bp y 18.571 bp respectivamente, así como una tercera parte duplicada invertida (IR, Inverted Repeat) formada por dos segmentos de 25.341 bp idénticos y en sentido opuesto, separados por la región SSC.

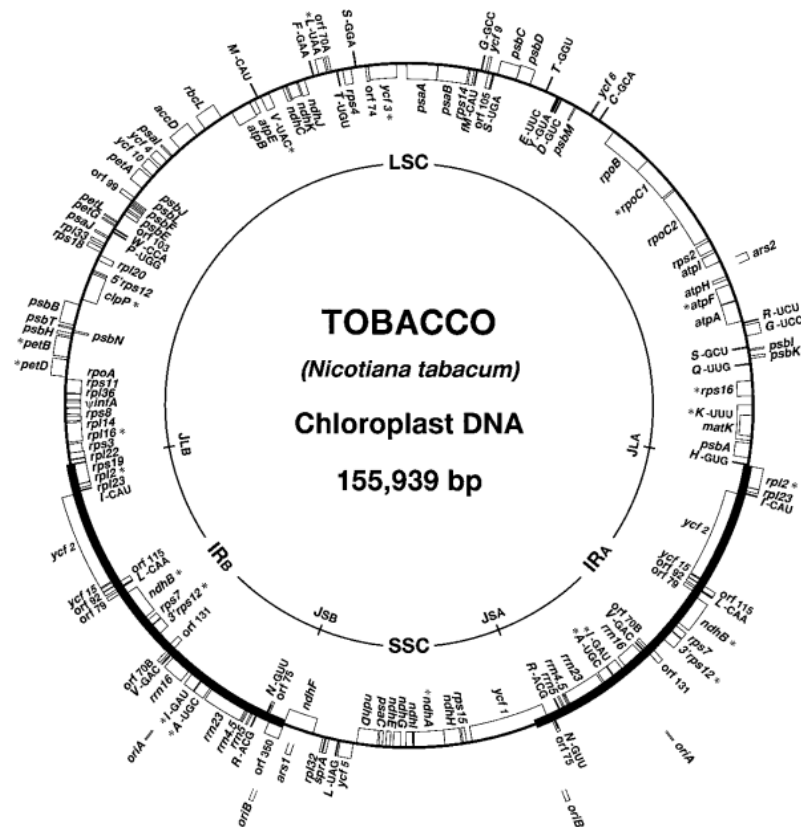


Figura 1.1: Mapa génico del AND del cloroplasto de tabaco (Wakasugi et al., 1998).

Los genes plastidiales son identificados por sus funciones preponderantes, aproximadamente se encuentran: 45 genes que codifican ARN, 27 genes que codifican proteínas relacionadas con la expresión génica (por ejemplo: los genes codificantes de las 4 subunidades de la ARNasa), 18 genes codificantes de proteínas de la membrana tilacoidal y 10 genes que codifican proteínas relacionadas con la transferencia de electrones (Wakasugi et al., 1998).

Los genes plastidiales están organizados principalmente en unidades de transcripción policistónica (operones) donde la transcripción de varios genes se realiza bajo el control de un mismo promotor y en un mismo ARNm que codifica varios polipéptidos.

La transcripción de genes en los plastidios se regula por dos ARN polimerasas diferentes, una codificada por el núcleo (NEP) y la otra plastidialmente (PEP). La NEP (nuclear encoded polymerase) tiene similitud con polimerasas de ciertos bacteriófagos, como la T7 ARN polimerasa (Hess & Börner, 1999). Mientras que la PEP (plastidial encoded polymerase) es una enzima de tipo procariótico. Existen varios factores sigma empleados por PEP y codificados nuclearmente, por lo que debe existir una estrecha conexión entre el plastoma y el núcleo. La maquinaria de traducción de los plastidios es muy similar al de las bacterias, pero ésta se ha adaptado a traducir ARN en los plastidios y no en células eucariotas (Marín-Navarro et al., 2007).

3.2 Bombardeo de Micropartículas (Biolística)

El método más empleado para la transformación plastidial es el biolístico, consiste en el bombardeo de células vegetales: embriones, brotes apicales, hojas, tejido calloso e incluso granos de polen inmaduro. Esta técnica fue desarrollada a finales de los 80 por el Dr. J. Sanford (Sanford et al., 1987 y Sanford 1988), confeccionando el sistema PDS-1000 (Figura 1.2) a principios de los 90.

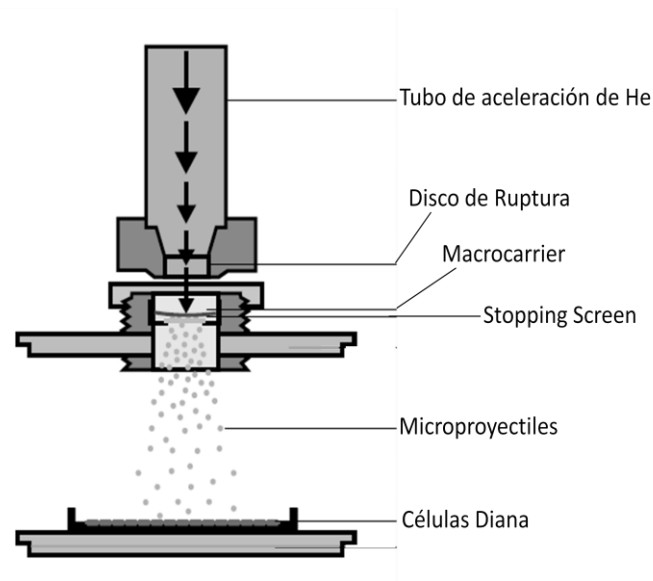


Figura 1.2: Sistema liberador de partículas PDS-1000/He Biolistic® (Biorad).

Las partículas que hacen de microprojectiles son de metales de alta densidad: oro o tungsteno, con un diámetro de 1 o 0,6 μm . La superficie de estos microprojectiles es recubierta con el plásmido o vector de interés. Para acelerar las partículas se utiliza gas helio a presión. El helio es retenido por un disco que tras su ruptura hace que se impulsen las partículas de metal. Hay gran variedad de discos de ruptura, diseñados para romperse con un rango de presiones entre 450 y 2.200 psi. Los microprojectiles se expanden sobre una película circular de plástico (macrocarrier) situado debajo del disco de ruptura en la cámara de vacío. Esta cámara de vacío evita que los microprojectiles se desaceleren debido a la fricción con el aire antes del impacto con el tejido diana. La quiebra del disco de ruptura, produce que el macrocarrier se desplace una corta distancia hasta una rejilla metálica que actúa como pantalla de parada (Stopping Screen). Como consecuencia el macrocarrier es retenido y las micropartículas se aceleran en dirección del tejido diana, atravesando la cámara de vacío. Las partículas se propulsan a una velocidad adecuada para penetrar las diferentes membranas e insertar el vector en el plástoma. Por tanto, el mecanismo de entrada del vector en el plástoma es mecánico. Las partículas de oro o tungsteno se proyectan siguiendo un patrón circular, cubriendo una superficie de mayor o menor extensión dependiendo de la distancia a la cual los tejidos están colocados por debajo de la pantalla de parada (Taylor & Fauquet 2002). El ADN de interés, una vez

introducido en el interior celular, puede integrarse dentro del genoma nuclear o en los plastos.

La primera transformación plastidial empleando esta técnica se logró en 1988 en *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al., 1988); un alga verde unicelular que posee clorofilas a y c, así como carotenoides y reservas de almidón. Un individuo mutado de esta alga poseía una supresión del gen *atpB*, por lo que carecía de la actividad cloroplástica de la ATPsintasa. Mediante biolística se consiguió introducir y expresar el gen *atpB* recuperando de esta forma la actividad fotosintética. En 1990 se logró la primera transformación plastidial sobre una planta superior, siendo ésta tabaco cv. Petite Havana (¹Svab et al., 1990).

Hasta la fecha se ha llevado a cabo la transformación plastidial exitosamente en 16 especies (Tabla 1.1) de las cuales, solo en tabaco se realiza rutinariamente.

Tabla 1.1: Especies vegetales transformadas empleando la aceleración de micropartículas.

ESPECIE	REFERENCIA
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) ¹	Svab & Maliga., 1990
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Sidkar et al., 1998
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>) ¹	Sidorov et al., 1999
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) ¹	Ruf et al., 2001
Petunia (<i>Petunia hybrida</i>)	Zubko et al., 2004
Soja (<i>Glycine max</i>) ¹	Dufourmantel et al., 2004
Algodón (<i>Gossypium spp</i>)	¹ Kumar et al., 2004
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	² Kumar et al., 2004
Álamo (<i>Populus alba</i>)	Okumura et al., 2006
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) ¹	Kanamoto et al., 2006
Chopo (<i>Populus spp.</i>)	Okumura et al., 2006
Col (<i>Brassica oleracea</i>)	Liu et al., 2007
<i>Marchantia polymorpha</i>	Chiyoda et al., 2007
Remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)	De Marchis et al., 2009
Colza (<i>Brassica napus</i>)	Cheng et al. 2010
Berengena (<i>Solanum melongena</i>)	Singh et al. 2010

¹ Especies en las que se han documentado líneas homoplásmicas fértiles.

3.3 Vectores de Transformación

Como vectores de transformación para la integración estable de ADN foráneo en el plastidio se emplean plásmidos. Los plásmidos son moléculas de ADN circulares, originalmente aisladas de bacterias (*E. coli*), donde se introduce el casete de expresión que contiene el transgén. El casete de expresión (Figura 1.3) está constituido por las secuencias flanqueantes (zonas de integración), promotores, gen marcador de selección, elementos regulatorios y el gen de interés (Verma & Daniell 2007). El transgén se sitúa entre una región promotora líder (PL) y entre un casete terminador (T). La región PL incluye el promotor y una región 5'UTR y el casete terminador T, una región 3'UTR.



Figura 1.3: Representación esquemática del casete de expresión en cloroplastos.

3.3.1 Secuencias Flanqueantes

El casete de expresión del transgén es flanqueado por dos secuencias cortas de 1 a 2 Kb que facilitan la recombinación homóloga y la inserción del casete en el lugar correcto del ADNpt. Se asume que las zonas de recombinación homóloga deben tener más de 400 pb a cada lado para que la eficiencia de transformación sea adecuada.

En el caso del tabaco hasta 13 lugares diferentes se han probado para la inserción del casete (Warzecha 2010). Una de las secuencias flanqueantes más empleadas es la *trnA* y *trnI* (Daniell et al., 1998). Los genes *trnA* y *trnI* son dos genes del ARN de transferencia. El gen *trnI* es codificante para el ARN transferente de Isoleucina y el gen *trnA* codifica el ARN transferente de Alanina; ambos se encuentran en la región duplicada invertida del ADNpt. Con el empleo de esta zona de inserción se han obtenido niveles de acumulación de proteínas de hasta 46,1% de PTS en hojas

maduras (De Cosa et al. 2001). Niveles de expresión incluso más altos se han obtenido en la interregión *trnfM* y *trnG* (Oey et al., 2009). Llegándose a acumular de forma estable más del 70% de PTS.

Sin embargo, se ha visto que es importante el diseño del vector para cada especie, la utilización en patata de vectores con zonas flanqueantes de tabaco produce eficiencias de transformación notablemente inferiores; a pesar de ser ambas especies solanáceas (Sidorov et al. 1999).

3.3.2 Promotores y Elementos Regulatorios

Los cloroplastos principalmente emplean el mecanismo transcripción-traducción procariótico (heredado de las cianobacterias), la organización en operones y la ARN polimerasa eubacterial. También el factor sigma y codones de inicio específicos son similares a los empleados por las bacterias.

La expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos está determinada por el nivel de transcripción, la estabilidad del ARNm y el nivel de traducción. Estos procesos están regulados por la acción de un promotor y regiones reguladoras 5' y 3'UTR. El empleo de elementos regulatorios 5' y 3'UTR endógenos puede causar eventos recombinatorios no deseados, por lo que se suele recurrir a elementos regulatorios procedentes de otras especies.

Sin embargo, la mayoría de los promotores empleados derivan de genes endógenos, tales como la región promotora del operón del ARN ribosómico 16S (*Prrn*), la del gen *psbA* (*PpsbA*) o la del gen *rbcl* (*Prbcl*). Los genes *psbA* y *rbcl* son regulados por la luz, ya que están involucrados en la fotosíntesis. De este modo los promotores *PpsbA* y *Prbcl* son promotores inducibles, lo que puede limitar en cierta medida su utilidad (Kim & Mullet 1994).

El promotor constitutivo más fuerte descrito hasta la fecha es la secuencia promotora *Prrn* (Svab & Maliga 1993) que es reconocido por NEP o PEP según la especie (en tabaco es usual que sea transcrito por PEP, mientras que el operón

equivalente en espinaca es transcrito exclusivamente por NEP). Puede emplearse el *Prrn* unido a la secuencia líder del gen 10 de la polimerasa del bacteriófago T7; hecho que proporciona un aumento de la traducción de los transcritos de ARNm en el plastidio vegetal (Lehmeier & Amann 1992).

3.3.3 Gen Marcador de Selección

El gen marcador de selección es aquel que permite seleccionar los transplastomas de aquellos que no han sido modificados y de este modo, tras 20 o 30 divisiones celulares (Maliga 2004) lograr la homoplasma bajo una fuerte presión de selección. Existen diversos genes marcadores de selección, dependiendo del medio de selección (Tabla 1.2): resistencia a antibióticos, resistencia a compuestos tóxicos (como herbicidas) o visual. Para la selección en estadios iniciales se recurre a genes que ofrecen resistencia a antibióticos, el más empleado es el gen bacteriano *aadA* que codifica aminoglucósido 3" adenil-transferasa (Goldschmidt-Clermont 1991) y ofrece resistencia a la espectinomicina y estreptinomicina. El *aadA* ha sido usado en la transformación plastidial de numerosas especies (Day & Goldschmidt-Clermont 2011) bajo el control del promotor *Prrn*.

Otros genes que otorgan resistencia a antibióticos son las mutaciones en genes codificantes del 16S ARN (*rrnS*, que ofrece resistencia a espectinomicina y estreptinomicina) o el 23S ARN (*rrnL*, que otorga resistencia frente a eritomicina). Estos dos genes se utilizan menos porque a diferencia del *aadA* son recesivos (o semirecesivos).

Más recientemente se ha desarrollado un nuevo gen marcador denominado: gen aureo *aadA* (*aadA*(Au)), (Tungsuchat-Huang et al., 2010). Este gen marcador incluye el gen marcador de selección *aadA* y además interfiere postranscripcionalmente con la expresión del gen plastidial *clpP1*. Como producto de la interferencia postranscripcional, se aprecia una deficiencia de la pigmentación en los plastidios no transformados. Esta ligera clorosis permite llevar a cabo una selección visual en invernadero.

Existen más genes marcadores de selección que son empleados en menor medida. Estos genes marcadores también ofrecen resistencia a antibióticos, pero con una menor eficiencia que el gen *aadA*. El gen *nptII* (Carrer et al., 1993) codifica neomicina fosfotransferasa II (NPTII) y el gen *aphA-6* (Huang et al., 2002) codifica aminoglucósido fosforasa, confiriendo ambos resistencia a Kanamicina.

Tabla 1.2: Principales genes empleados como marcadores de selección.

Tratamiento y gen	Expresión	Referencia
<i>aadA</i>	Aminoglucósido 3" adenil-transferasa	² Svab et al., 1990
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa II	Carrer et al., 1993
<i>codA</i>	Citosina deaminasa	Serino & Maliga 1997
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	Daniell et al., 1990
<i>gfp</i>	Green fluorescent protein	Hibberd et al., 1998
<i>aadA-gfp</i>	Unión de <i>aadA</i> y <i>gfp</i>	Sarwar & Maliga 1999
<i>aadA</i> (au)	Deficiencia en pigmentación y <i>aadA</i>	Tungschat-H. et al., 2010

4. Oxidorreductasas

Las oxidorreductasas (enzimas de clase 1) catalizan reacciones de oxidación-reducción (redox). Es decir, catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donante (reductor o dador, que pierde electrones) hacia una molécula oxidante (o aceptor) electrónico, que es reducida. Para efectuarse las reacciones redox han de estar presentes a la vez el aceptor y el dador electrónico.

4.1 Tiorredoxinas (Trx)

Las tiorredoxinas son oxidorreductasas de pequeño tamaño (masa molecular próxima a los 12KDa) con un sitio activo ditiol-disulfuro y con una estructura terciaria característica que consiste en 5 láminas β y 4 hélices α . Estas enzimas son muy reactivas en estado reducido y su principal función es reducir puentes disulfuro de otras proteínas (Jacquot et al., 1997).

Las Trx están presentes en todos los seres vivos, la excepción es el reino Archaea en el cual existen proteínas con centros activos similares a las tiorredoxinas pero no pueden ser consideradas como tales (Bhattacharyya et al., 2002).

En bacterias y células de mamíferos existen únicamente dos tipos de tiorredoxinas, mientras que en células vegetales existen numerosos tipos, distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares. En las plantas el sistema tiorredoxina presenta múltiples isoformas, siendo nucleares todos los genes que las codifican. En plantas se han reconocido hasta 19 tipos de tiorredoxinas (Schürmann & Buchanan 2008) y se estima que las tiorredoxinas vegetales pueden estar relacionadas con alrededor de 300 proteínas diana (Lemaire et al., 2007).

Las tiorredoxinas vegetales se pueden clasificar según su localización intracelular: en las mitocondrias, en el citoplasma o en los cloroplastos.

En el grupo de tiorredoxinas de tejidos no fotosintéticos se engloban a las tiorredoxinas presentes tanto en mitocondrias como en el citoplasma. En las mitocondrias no se sabe con certeza el papel de las tiorredoxinas (Schurmann & Jacquot 2000) sin embargo, la Trx *h* del citoplasma ha sido muy estudiada. Se denomina Trx *h* porque fue aislada de tejidos heterótrofos de la planta (Suske et al., 1979). La actividad más notable de las Trx *h* es durante la germinación de semillas, el sistema reductor de las Trx *h* está involucrado en la movilización de compuestos de reserva. También se han encontrado evidencias de la actividad de las Trx *h* en el mecanismo de la autoincompatibilidad polen-estilo y en la defensa frente al estrés oxidativo.

En los cloroplastos se han identificado 5 tipos de tiorredoxinas: Trx *f*, Trx *m*, Trx *x*, Trx *y*, Trx *z* (Collin et al., 2004; Arsova et al., 2010). Las más estudiadas son la Trx *m* y la Trx *f* por estar asociadas a la regulación del metabolismo del carbono dependiente de la luz a través del ciclo de las pentosas fosfato y del ciclo C4 (Figura 1.6).

La Trx *m*, que debe su nombre a que fue descubierta como reductora de la NADP-malato deshidrogenasa (Mestres-Ortega & Meyer 1999), es de origen procariota, está codificada nuclearmente y se encuentra asociada débilmente a las membranas externas del tilacoide. La Trx *f* es capaz de reducir y activar la enzima fructosa-1,6-bifosfata (FBPasa), (Schürmanna & Wolosiukb 1978) y tiene un origen eucariota.

El papel fundamental de las Trx es ejercer modificaciones redox sobre otras proteínas, lo que puede provocar bien su activación o bien su inactivación. Debido al alto número de dianas que tienen, están implicadas en la mayoría de los procesos celulares (Schürmann & Buchanan 2008). Los principales procesos regulados por las tiorredoxinas cloroplástica son:

Ciclo de Calvin, Ciclo C4	Estrés oxidativo	Degradación de proteínas
Metabolismo del nitrógeno	Biosíntesis de isoprenoides	Equilibrio $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$
Metabolismo del azufre	Biosíntesis de tetrapirroles	Degradación del almidón
Biosíntesis de ácidos grasos	Biosíntesis de vitaminas	Glicólisis
Traducción	Ensamblaje/pegado de proteínas	División plastidial
Ciclo de las pentosas fosfato	Replicación del ADN	

4.2 Tiorredoxina Reductasas

Cuando la Trx ha ejercido su función reductora se oxida y es necesario un agente externo para devolverla al estado activo reducido. Esta reducción puede llevarse a cabo por dos vías, el Sistema NADPH Tiorredoxina Reductasa y el Sistema Ferredoxina Tiorredoxina Reductasa.

4.2.1 Sistema NADPH Tiorredoxina Reductasa (NTR)

Las Trxs *h* presentes en el citoplasma son reducidas por la molécula NADPH, mediante la enzima NADPH-dependiente tiorredoxina reductasa (NTR), (Johnson et al., 1987). Las moléculas de NADPH inician la cadena de transporte de electrones reduciendo la molécula NTR que a su vez reduce al puente disulfuro del centro activo de las Trx. Las Trx, una vez reducidas, pueden actuar de nuevo como agentes reductores de otras proteínas diana (Figura 1.4).

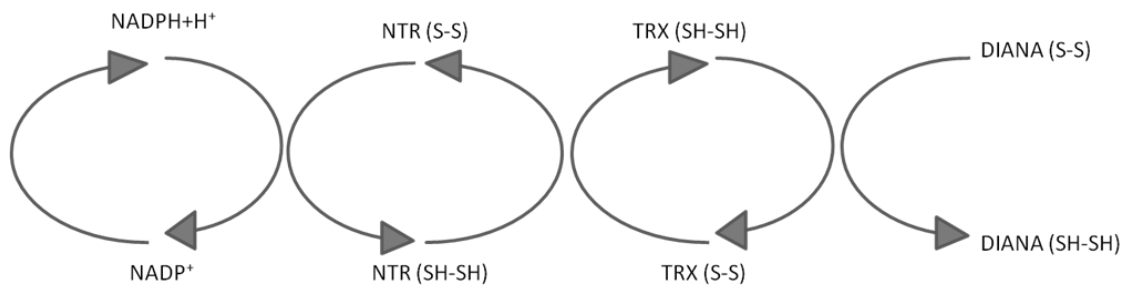


Figura 1.4: Sistema NTR.

4.2.2 Sistema Ferredoxina Tiorredoxina Reductasa (FTR)

Las tiorredoxinas de los cloroplastos son reducidas por moléculas de ferredoxina (Fd) mediante la enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), (Buchanan 1991). Las moléculas de ferredoxina (Fd) reducidas a través de la cadena de transporte de electrones del fotosistema I (PSI), reducen la enzima FTR que a su vez reduce las Trxs de los cloroplastos. Las Trxs, una vez reducidas, pueden actuar de nuevo como agentes reductores de otras proteínas diana (Figura 1.5).

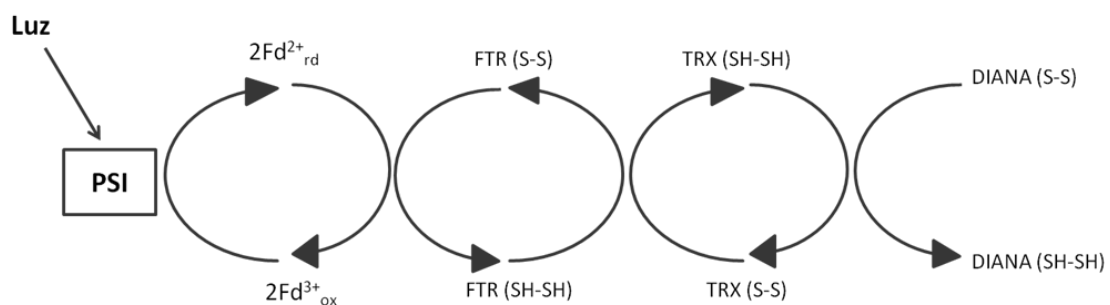


Figura 1.5: Sistema FTR en cloroplastos.

4.3 NADPH Tiorredoxina Reductasa Cloroplástica (NTRC)

Gracias a la secuenciación completa del genoma del arroz, en 2004 se identificó un nuevo gen NTR en arroz, que se denominó NTRC (Serrato et al., 2004). Este gen codifica la proteína NTRC, una enzima que posee un dominio NTR en el extremo amino-terminal y otro Trx en el extremo carboxilo-terminal y se localiza en los cloroplastos.

Como se ha expuesto, el NTR es parte del Sistema reductor del citoplasma, sin embargo la enzima NTRC es la primera NTR localizada en el cloroplasto. Por tanto, el interés de la enzima radica en la bifuncionalidad de la NTR y la Trx en una sola proteína, además de ser una enzima propia del citoplasma localizada en el cloroplasto.

Desde que se comenzó a estudiar el gen NTRC, se intuyó la actividad de esta enzima bifuncional frente al estrés oxidativo y la regulación homeostática de los procesos redox. Durante la fotosíntesis se realiza el transporte de electrones en condiciones aerobias. Este transporte, genera moléculas de oxígeno muy reactivas entre las que se incluye: el singlete oxígeno (un átomo de oxígeno en estado excitado o ion O^{2-}), radicales libres superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (o agua oxigenada H_2O_2), (Mittler 2002).

El peróxido de hidrogeno, a niveles bajos, es un mensajero secundario involucrado en la regulación de numerosos genes. Sin embargo, en concentraciones altas puede llegar a ser tóxico (Vandenabeele 2003). Si existe un exceso de peróxidos en el cloroplasto, estos son degradados por las peroxirredoxinas (Prxs), siendo la 2-Cys Prxs la más activa en la degradación del peróxido de hidrógeno en agua.

Los últimos estudios realizados con NTRC suponen que la enzima puede actuar como donadora de electrones al sistema de destoxificación del cloroplasto. De este modo, la NTRC transferiría electrones (de forma alternativa) del sistema NADPH al 2-Cys Prxs plastidial (Pérez-Ruiz et al., 2006), (Figura 1.6).

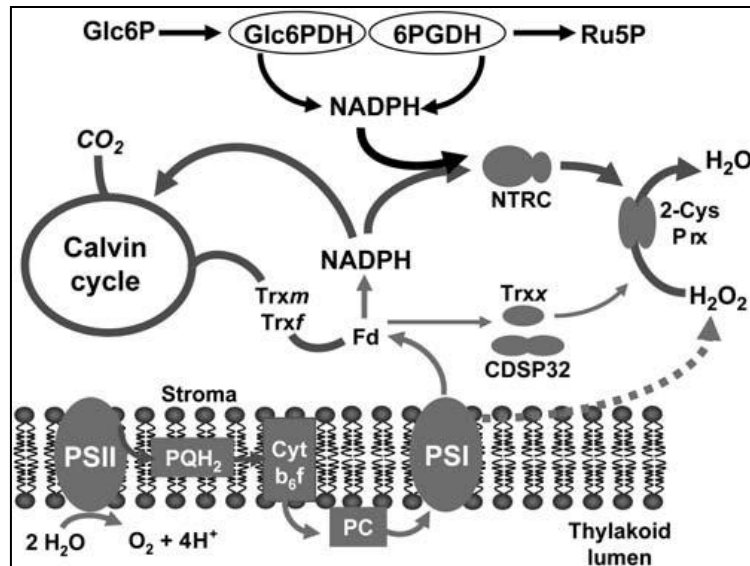


Figura 1.6: Esquema propuesto para la desintoxicación del cloroplasto por la NTRC, ruta alternativa de donación de electrones (Pérez-Ruiz et al., 2006).

ANTECEDENTES

La primera sobreexpresión de Trx se realizó sobre cebada en el endospermo de las semillas. Con esta sobreexpresión (de unas 30 veces la normal) se consiguió incrementar 4 veces la actividad de la enzima “starch-debranching” (Cho et al., 1999). Pocos trabajos más se han realizado en cuanto a sobreexpresión de Trxs, todos ellos con Trxs *h* y sobre cereales.

Más recientemente, en el grupo de investigación de Agrobiotecnología Vegetal (CSIC-UPNA) se han sobreexpresado Trxs cloroplástica en tabaco. En un primer trabajo se emplearon Trxs *f* y Trxs *m* como reguladores en la expresión de proteínas recombinantes, en este caso de albúmina sérica humana (HSA). Se trazaron 2 estrategias, la co-expresión y la fusión de Trxs con HSA, ambas con resultados diferentes. La fusión de Trxs-HSA incrementó la acumulación de proteínas recombinantes hasta más del 26% de la proteína total, resultado de la estabilidad de las proteínas fusionadas. La co-expresión de Trxs con HSA no produjo un incremento en la acumulación de proteínas, pero sí limitó la formación cuerpos de inclusión en la proteína sintetizada. Aunque se relataron diferencias entre la fusión y co-expresión, no se encontraron diferencias entre el tipo de Trxs en la regulación de la síntesis de proteínas recombinantes (¹Sanz-Barrio et al., 2011).

Un trabajo posterior demostró que estas enzimas tienen también actividad chaperona, facilitando el correcto plegamiento de otras proteínas (²Sanz-Barrio et al., 2011).

En un último trabajo, todavía sin publicar, se muestra el efecto de la sobreexpresión plastidial de Trx *f* en la acumulación de almidón en hojas de tabaco. Este hecho podría ser de gran importancia en otras especies vegetales que acumulen almidón, por lo que actualmente se estudia la sobreexpresión de Trx *f* y Trx *m* en patata.

OBJETIVOS

1. El objetivo de este trabajo fin de carrera será sobreexpresar plastidialmente el gen NTRC en tabaco empleando el método biolístico. Para ello se utilizarán dos promotores para el gen NTRC, el promotor fotoinducible *PpsbA* y el constitutivo *Prn*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La totalidad del proceso expuesto en material y métodos fue realizado en el Instituto de Agrobiotecnología, campus de Arrosadía, Mutilva Baja (31192) Pamplona, Navarra.

1. Cultivo *in vitro* del Material Vegetal

1.1 Material Vegetal

El material vegetal objeto del presente trabajo es la variedad no comercial Petite Havana SR1 de Tabaco (*Nicotiana tabacum*).

1.2 Medios de Cultivo

1.2.1 Medio P3

Para la preparación de un litro de medio de cultivo P3 (Tabla 4.1) se añadió 4,41g de Sales Murashige&Skoog (Micro y macroelementos con vitaminas *ref.* M0222 Duchefa) y 30g de Sacarosa sobre un vaso de precipitados. Las Sales y la Sacarosa se disolvieron en agua miliQ y el pH se ajustó a 5,7 - 5,8 empleando hidróxido de potasio (KOH 0,1M). El volumen final se enrasó en probeta y se vertió en una botella de vidrio autoclavable con 6g de MicroaAgar (*ref.* Duchefa M1002). El medio se esterilizó tras pasar por el autoclave durante 15 minutos a 121°C. Una vez esterilizado se dispensó en botes de vidrio estériles a razón de 50ml por bote aproximadamente.

Para la preparación del medio P3 con 500mg/l de antibiótico, por cada litro de medio se añadieron 5ml de una solución de espectinomicina (100mg/ml) previamente esterilizada por filtración. La adicción del antibiótico se realizó en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar) una vez que el medio P3 autoclavado se hubiera enfriado a unos 60°C. Posteriormente se dispensó en botes de vidrio a razón de 50ml por bote aproximadamente.

Tabla 4.1: Medio de cultivo P3

Constituyente	Cantidad por litro
Sales Murashige&Skoog (Micro y macroelementos con vitaminas)	4,41 g
Sacarosa	30 gr
MicroAgar	8 g

1.2.2 Medio RMOP

Para la preparación de un litro de medio de cultivo RMOP (Tabla 4.2) se añadieron en un vaso de precipitados 4,3g de Sales Murashige&Skoog (Micro y macroelementos sin vitaminas *ref.* M0221 Duchefa), 30g de Sacarosa, 100mg de MyoInositol (*ref.* Sigma I5125), 100µg de ANA (Auxina α -naphthaleneacetic acid solution *ref.* Sigma N-1641), 1mg de BAP (Citoquinina 6-benzylaminopurine solution *ref.* Sigma B.3274) y 1mg de Tiamina HCl (*ref.* Aldrich 10,917-7). Se ajustó el pH de la mezcla disuelta en agua miliQ a valores entre 5,7 y 5,8 (empleando KOH 0.1M), se vertió en una botella de vidrio con 6g de MicroAgar y se autoclavó 15minutos a 121°C antes de dispensar unos 25ml por placa Petri o 40ml por caja Magenta (Magenta Chicago GA7).

Para la preparación del medio RMOP con espectinomicina, en 1 litro de medio RMOP enfriado hasta unos 60°C tras el autoclavado, se añadieron en cabina 500mg de espectinomicina a partir de una solución previamente esterilizada por filtración. El medio RMOP con 500mg/l de espectinomicina se dispensó en cajas Magenta a razón de 40ml por unidad.

Tabla 4.2: Medio de cultivo RMOP

Constituyente	Cantidad por litro
Sales Murashige&Skoog (Micro y macroelementos sin vitaminas)	4,3 g
Sacarosa	30 g
Myoinositol	100mg
ANA	100µg
BAP	1mg
Tiamina HCl	1mg
MicroAgar	6 g

1.3 Condiciones del cultivo *in vitro*

Las condiciones de cultivo fueron comunes para todos los pasos de cultivo *in vitro* realizados a lo largo de todo el trabajo fin de carrera.

i. Todas las manipulaciones del material vegetal se realizaron en condiciones de esterilidad: en cabina de flujo laminar y con materiales previamente esterilizados.

ii. El crecimiento *in vitro* del material vegetal, tanto en medio P3 como medio RMOP se realizó en la misma cámara de cultivo. La cámara de cultivo tiene una temperatura constante de 28°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La iluminación en cada estantería presenta una intensidad de $120 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

2. Transformación Plastidial

2.1 Preparación del Material

2.1.1 Material Vegetal

Las células diana de la transformación plastidial fueron las de hojas de tabaco. Para su obtención se sembraron semillas de tabaco en botes con medio P3. Tras germinar las semillas se trasplantaron 3 plántulas de tabaco por bote y tras 3 semanas de crecimiento se realizó un subcultivo de brotes apicales, poniendo un brote apical por bote. Tras 3-4 semanas de crecimiento, se cortaron en la cabina de flujo laminar hojas completamente desarrolladas de la mitad superior de la planta. Las hojas seleccionadas se colocaron en placas Petri con medio RMOP sobre el que previamente se había colocado un disco de papel de filtro estéril. Las hojas se colocaron a razón de 1 hoja por placa con el haz en contacto con el papel de filtro. Una vez preparadas las hojas se dispuso el bombardeo en un plazo de 1 o 2 horas, para evitar la excesiva deshidratación de las mismas.

2.1.2 Vector

El plásmido de partida en la construcción del vector de transformación es el pAF (Fernández-San Millán et al., 2008); (Figura 4.1). El vector pAF incluye las secuencias flanqueantes *trnI* y *trnA*, dos genes presentes en la región duplicada invertida del ADN plastidial (ADNpt) de tabaco. El pAF incorpora como gen marcador de selección el *aadA*, regulado por el promotor del gen *rrn* de tabaco (*Pr_{rrn}*). El pAF contiene también el terminador del gen *psbA* de tabaco (3'*psbA*). Entre el gen marcador de selección (*aadA*) y el terminador del gen *psbA* de tabaco se encuentra la zona de multiclonaje (MCS).



Figura 4.1: Representación esquemática del vector pAF.

Partiendo como base del vector pAF se crearon dos vectores de transformación diferentes. Ambos contenían el gen NTRC de *Arabidopsis thaliana*, pero diferían en el promotor empleado para la regulación del mismo. Uno de ellos utiliza el promotor inducible por luz y la región 5'UTR del gen *psbA* de tabaco (*PpsbA*) vector pAF *PpsbA* NTRC (Figura 4.2) y el otro utiliza el promotor constitutivo del gen *rrn* de tabaco y la región 5'UTR del gen 10 del bacteriófago T7 (*PrrnG10L*) vector pAF *Prrn* NTRC (Figura 4.3).

Tras la construcción de los vectores de transformación y sin clonación en la estirpe TOP10F' de *E. coli*, se procedió a su purificación mediante miniprep con el kit QIAprep® Spin Miniprep kit de QIAGEN.

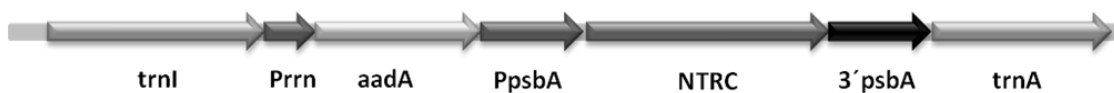


Figura 4.2: Representación esquemática del vector pAF *PpsbA* NTRC.

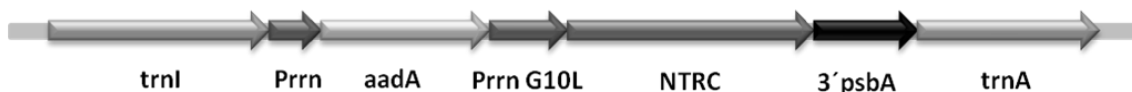


Figura 4.3: Representación esquemática del vector pAF *PrrnG10L* NTRC

2.1.3 Projectiles

Como proyectil de bombardeo se emplearon 50 mg de partículas de oro de 0,6µm de diámetro (Bio Rad®) resuspendidas en 833 µl de glicerol al 50% previamente esterilizado por filtración.

Las partículas de oro se vortexearon para homogeneizar la muestra y se recogió un volumen de 50µl en un eppendorf. Se añadió 1500ng de ADN en un máximo de 10µl de la miniprep y se vortexeó. A continuación se añadió 50µl de cloruro cálcico (CaCl₂) 2,5M esterilizado por filtración y se vortexeó. Por último se agregó 20µl de espermidina 0,1M esterilizada por filtración, se vortexeó y se colocó el eppendorf en agitación en el termomixer durante 20 minutos, a una temperatura de 4°C y 1.400rpm.

Pasados los 20 minutos se realizó el lavado con etanol. Para ello se añadió 200µl de etanol al 99,9%, se vortexeó para homogeneizar la mezcla y se centrifugó 30 segundos a 3.000rpm para decantar las partículas de oro recubiertas de ADN. Una vez retirado todo el etanol posible con la pipeta, el lavado se repitió 5 veces para finalmente resuspender los proyectiles en 30µl de etanol (99,9%). Una vez preparados, se mantuvieron en hielo y se dispuso el bombardeo en un plazo máximo de 1 hora.

2.2 Bombardeo

Para la aceleración de las partículas áureas se empleó el cañón de micropartículas “Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System” así como los macrocarries, discos de ruptura y stopping screen; todo ello marca Bio Rad® y siguiendo las especificaciones del fabricante. En la página web de Bio Rad (www.biorad.com), se puede encontrar un extenso documento para el uso del cañón “Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System” detallando el mantenimiento y empleo del mismo.

En la cabina de flujo laminar, y previa desinfección del cañón de genes con etanol al 70%; se dispensaron aproximadamente 5µl de la solución de proyectiles sobre la parte central del macrocarrier. En el tubo de aceleración de gas se acumula helio (He) a una presión de 1.350psi (94,91kgf/cm²). Cuando alcanza la presión de ruptura; que en este trabajo fue de 1.100psi (77,33kgf/cm²) el helio rompe el disco de ruptura e impacta sobre la superficie del macrocarrier. El macrocarrier es empujado hacia el stopping screen. El stopping screen detiene el macrocarrier y salen proyectadas las partículas de oro con el material genético hacia las células diana. En este trabajo las células diana, situadas en el envés de las hojas de tabaco se colocaron a una distancia de 9cm. El proceso se realiza en condiciones de vacío de 27 pulgadas Hg (0,902atm).

Tras el bombardeo las placas Petri se sellaron con parafilm y se recubrieron con papel de aluminio para someter las hojas a oscuridad, durante 48 horas y una temperatura de 28°C. De este modo se reduce la actividad fotosintética y se propicia la agregación del plastoma al ADNpt.

2.3 Obtención de Regenerantes

2.3.1 Primera Roda de Selección

Tras las 48 horas de oscuridad estipuladas se procedió a la primera ronda de selección. En una atmósfera estéril (cabina de flujo laminar) se eliminó el nervio central de las hojas bombardeadas ayudado de pinzas y bisturí. El limbo restante se seccionó en cuadrados de aproximadamente 0,5cm de lado que fueron cultivados en cajas Magenta conteniendo medio RMOP con 500mg/l de espectinomicina. Se colocaron 4 trozos de hoja por caja con el envés en contacto con el medio. Las cajas se sellaron con parafilm y se alojaron en la cámara de cultivo bajo las condiciones expuestas en el apartado 1.3 de material y métodos durante aproximadamente 4 semanas, hasta la aparición de regenerantes tolerantes a la espectinomicina.

2.3.2 Segunda Ronda de Selección

Una vez aparecidas las primeras congregaciones de células indiferenciadas (callos) y tras surgir los primeros brotes se procedió a la segunda ronda de selección, con la que se pretende obtener homoplasma. Las pequeñas hojas de los brotes se subcultivaron de la misma forma descrita en el apartado superior: secciones cuadradas, en este caso de aproximadamente 0,2cm de lado, previa eliminación del nervio central y poniendo en contacto el envés con el medio RMOP con 500mg/l de espectinomicina. Las cajas se alojaron en la cámara de cultivo durante 3-4 semanas, hasta la aparición de brotes.

2.3.3 Subcultivo de Brotes

Después de la segunda ronda de selección, se procedió a repicar los nuevos brotes, sobre medio P3 con espectinomicina. El cultivo *in vitro* cesó tras el enraizamiento de los brotes y crecimiento de las plantas de tabaco. En este momento las plantas se trasladaron a *Jiffy* para el proceso de aclimatación en el fitotrón. El *Jiffy* se rellenó con una mezcla que contenía 3 partes de sustrato universal ("*Flower*" de *Campo*) y 1 parte de perlita. Tras el trasplante los *Jiffys* se colocaron sobre una bandeja de plástico, se regaron con solución Hoagland (0,6x) y se cubrieron con una tapa de plástico para aumentar la humedad relativa (HR) y favorecer el trasplante. Cuando las plantas de tabaco ya aclimatadas mostraban un desarrollo adecuado, se trasladaron a macetas con el mismo sustrato que en *Jiffy* al que se había añadido abono de liberación lenta.

Durante el proceso de crecimiento se recogieron muestras de hojas de las diferentes plantas y fueron congeladas empleando nitrógeno líquido para posteriores análisis.

3. Análisis de los Regenerantes

3.1 Extracción del ADN. Método CTAB

El ADN se extrajo de hojas jóvenes de tabaco. Para pulverizar el tejido vegetal, los eppendorfs de 2ml con tres esferas de acero y con las muestras vegetales congeladas en nitrógeno líquido se colocaron en el microdesmembrador durante 1minuto y 30segundos a 2.000 rpm (las muestra se mantuvieron congeladas durante todo el proceso).

Una vez pulverizado el tejido vegetal, se añadieron 400µl de *buffer CTAB* (Tabla 4.3) precalentado a 60°C y se mantuvo durante 30minutos en agitación en termomixer a 60°C. Posteriormente se añadieron 400µl de cloroformo/isoamílico (24:1). Tras homogenizar la solución se centrifugó durante 3minutos a 14.000rpm. Después de centrifugarse y diferenciarse las tres fases (inorgánica, interfase y orgánica) se traspasó el sobrenadante a eppendorfs de 1,5ml.

A continuación se añadió 1Volumen (1V) de cloroformo/isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 3minutos a 14.000rpm. De nuevo se recogió el sobrenadante y se traspasó a nuevos eppendorfs añadiendo 0.7V de Isopropanol preenfriado a -20°C. Se mezcló por inversión y se dejó reposar 30minutos a -20°C. Después se centrifugó a 4°C durante 3 minutos a 14.000rpm y se retiró el sobrenadante conservando el pellet. El pellet se lavó con 700µl de etanol (70%) a -20°C durante 60 minutos a -20°C.

Pasado este tiempo, se centrifugó a 4°C durante 3minutos a 14.000rpm y se retiró todo el sobrenadante. Para secar completamente el pellet se pusieron durante unos minutos los eppendorfs en la termomixer precalentada a 42°C. Finalmente el pellet seco se resuspendió en 50µl de agua miliQ con 100µg/ml de ARNasa. Las muestras se dejaron incubar 30minutos a 37°C y después se conservó a -20°C, preparado para su posterior cuantificación.

Tabla 4.3: *Buffer CTAB*

Constituyente	Cantidad
Sorbitol	1,3 g
TRIS-HCL 1M pH8	11ml
EDTA	0,4g
NaCl	2,3g
N-Laurylsarcosine	0,5g
CTAB	0,4g

3.2 Cuantificación ADN

Extraído el ADN por el método CTAB se cuantificó su concentración con un espectro “Eppendorf BioPhotometer”. Para ello, se prepararon diluciones 1:200 de cada muestra con agua miliQ. Tras calibrar el espectrofotómetro, asignando la lectura en blanco con una muestra de agua miliQ, se realizó la cuantificación de cada muestra utilizando volúmenes de 50µl.

3.3 Análisis Southern Blot

El análisis siguiendo el método Southern Blot, permite la identificación de secuencias específicas de ADN mediante la electroforesis en un gel de agarosa. Para ello, las secuencias deben estar fragmentadas empleando enzimas de restricción (digestión). Los segmentos obtenidos se separan de mayor a menor tamaño mediante una corriente eléctrica en un gel de agarosa. Posteriormente se realiza la transferencia del ADN a la membrana donde se hace la hibridación con una sonda marcada que reconoce la secuencia de específica que se quiere identificar.

Digestión

Las muestras se digirieron con la enzima *BglII* (Biolabs) en volúmenes finales de reacción de 30µl. En cada digestión se añadió 20µg de ADN (suponiendo volúmenes diferentes para cada muestra dependiendo de su concentración), 3µl de *Buffer* 10x de digestión, 3µl de enzima (10.000 U/ml) y el volumen correspondiente de agua miliQ para completar 30µl. Las digestiones se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Electroforesis

Pasada la noche y con el ADN digerido, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. En un matraz aforado se añadió 1,23g de Agarosa y 175ml de TAE1X (Tabla 4.4). La mezcla se hirvió en el microondas hasta disolverse la agarosa completamente. Tras enfriarse ligeramente se añadió 16µl de Bromuro de Etidio (0,001%) y se vertió en una cubeta portageles. Se colocó el peine para obtener los pocillos y se dejó enfriar para su solidificación.

Una vez solidificado, el gel se situó en una cubeta de electroforesis y se añadió TAE1X hasta sumergir el gel. En los pocillos se cargaron las muestras a las que previamente se les había añadido 4µl de tampón de carga. El primer pocillo se reservó para cargar 3µl de marcador de peso molecular “Hyperladder 1 (Bioline)” y el resto para las muestras. La electroforesis se realizó a 90V durante 4horas. Pasadas las 4horas se fotografió el gel iluminado con luz UV.

Tabla 4.4: TAE1X

Constituyente	Cantidad
Tris	4,84 g
Ác. Acético Glacial	1,14ml
EDTA 0,5M pH8	2ml
Agua miliQ	c.s.p 1.000ml

Transferencia del ADN del Gel a la Membrana de Nylon

Para la transferencia del ADN, se realizaron una serie de incubaciones previas con diferentes soluciones en una cubeta con agitación suave. El primer paso realizado fue la depurinación, que consiste en eliminar las purinas para fragmentar las secuencias de ácidos nucleicos y de este modo facilitar la transferencia del ADN. Para ello se empleó una solución de HCl (0,2N) durante 10 minutos. Pasados los 10 minutos se lavó el gel con agua miliQ durante 5 minutos. El segundo paso fue desnaturalizar el ADN, para facilitar la unión a la sonda. Para la desnaturalización se empleó durante 45 minutos una solución de NaCl (1,5M) y NaOH (0,5M). Se repitió el lavado con agua miliQ durante 5 minutos. Por último se realizó una neutralización con una solución neutralizadora (Tris HCl 1M pH 7,4 y NaCl 1,5M) durante dos tandas, una de 30 minutos y otra de 15 minutos.

Para la transferencia propiamente dicha, se realizó el siguiente montaje: se llenaron los dos pocillos de una cubeta de electroforesis con solución de transferencia 20xSSC (Tabla 4.5) y se estableció un puente de papel *Whatman* (15x30cm) entre ellos. Sobre el puente se colocó el gel (preincubado durante 5 minutos en la solución de transferencia 20xSSC) boca abajo.

Sobre el gel se colocó la membrana de nylon (NYTRAN®N) de 14x15cm (previamente hidratada con agua miliQ y la solución de transferencia 20xSSC). Sobre la membrana se colocó una pieza de 14x15cm de papel *Whatman* una pila de servilletas de papel y peso. La transferencia se realizó toda la noche, por la diferencia de potencial osmótico entre los pocillos de la cubeta y las servilletas secas (el paso de la solución de transferencia por el gel transporta los ácidos nucleicos hasta la membrana de transferencia, donde quedan fijados).

Pasada la noche se retiraron las servilletas, el papel *Whatman* 15x14 y se marcó con lápiz la zona de la membrana que coincidía con los pocillos, de esta manera se supo las distancias de referencia y la orientación.

Tabla 4.5: Solución de Transferencia 20xSSC pH 7

Constituyente	Cantidad
NaCl	173,3 g
Trisodium Citrate Dihydrate	82,2 g
Agua miliQ	c.s.p 1.000ml

Fijación

El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz UV en un Crosslinker de 1.200 μ Julios.

Hibridación de la Membrana

La hibridación y revelado se realizó con el *DIG High Prime DNA labeling and Delection Starter kit II* (Roche). La sonda marcada corresponde al fragmento BamHI-BglII que abarca el final del gen *trnI* y el principio del *trnA*.

En primer lugar se realizó una pre-hibridación de la membrana durante 4 horas en la mini-oven a una temperatura de 42°C con 20ml de solución de hibridación *Dig EasyHyb*. A continuación se añadió la sonda previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 68°C; y la hibridación continuó a 42°C durante toda la noche.

Lavado de la Membrana e Incubación con el Anticuerpo

Primero se realizaron 2 lavados de 5 minutos con 250ml de la solución de *Lavado 1* (Tabla 4.6) sobre una cubeta en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron otros 2 lavados de 15 minutos con 100ml de la sonda de *Lavado 2* (Tabla 4.7) en la mini-oven a 68°C. A partir de ese momento, los siguientes pasos se realizaron en una cubeta en agitación a temperatura ambiente. La membrana se lavó con 100ml de *Washing buffer* (Tabla 4.8) durante 5 minutos y después se incubó con la solución de bloqueo aportada por el kit durante 45 minutos. A continuación se incubó durante 1 hora con *Antiboy Solution*, la solución que contiene el anticuerpo que

reconoce la sonda marcada y que está asociado a una fosfatasa alcalina. Pasada la hora se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno con 50ml de *Washing buffer*. Para adecuar el pH para la reacción de la fosfata se incubó la membrana durante 5 minutos en 20ml de *Detection Buffer* (Tabla 4.10).

Por último, la membrana se colocó entre dos láminas de plástico manteniendo la zona del ADN hacia arriba. Con pipeta se repartió sobre la superficie 1ml de la solución CSPD aportada por el kit. Dicha solución contiene el sustrato sobre el que actúa la fosfatasa alcalina en una reacción de quimioluminiscencia. La membrana se incubó durante 10 minutos a 37°C.

Tabla 4.6: Solución de *Lavado 1*

Constituyente	Cantidad
20X SSC	50ml
SDS 20%	2,5ml
Agua miliQ	447,5ml

Tabla 4.7: Solución de *Lavado 2*

Constituyente	Cantidad
20X SSC	5ml
SDS 20%	1ml
Agua miliQ	194ml

Tabla 4.8: *Washing Buffer*

Constituyente	Cantidad
Maleic acid buffer (Tabla 4.9)	200ml
Tween 20	600µl

Tabla 4.9: Maleic acid buffer pH 7,5

Constituyente	Cantidad
Ácido maléico	11,607g
NaCl	8,766g
Agua miliQ	c.s.p 1.000ml

Tabla 4.10: *Detection Buffer* pH 9,5

Constituyente	Cantidad
Tris	6,055g
NaCl	2,992g
Agua miliQ	c.s.p 500ml

Exposición y Revelado

En condiciones de obscuridad se colocó una película de revelado sobre la membrana en el interior de un casete de exposición y se expuso durante 1 hora. Pasada la hora se reveló la película en la sala de revelado. Para ello se sumergió brevemente la película en la solución reveladora y una vez revelada la imagen, se enjuagó con agua y se sumergió en líquido fijador. Finalmente se dejó secar la película.

RESULTADOS

En este apartado, con el objetivo de obtener plantas transplastómicas que sobreexpresen el gen NTRC se han bombardeado hojas de tabaco (cv. Petite Havana) con dos vectores diferentes: el vector pAF PpsbA NTRC (en el que el gen NTRC está regulado por el promotor fotoinducible *PpsbA* (Figura 4.2) y el vector pAF PrnG10L NTRC (en el que el gen NTRC está regulado con el promotor constitutivo *Prn* (Figura 4.3).

1. Bombardeo con el Vector pAF PpsbA NTRC

Este fue el primer bombardeo y se realizó el 15 de marzo del 2011. Se dispararon 5 hojas, pertenecientes todas ellas a la misma planta. Las hojas fueron numeradas en orden creciente de edad (descartando las hojas más jóvenes que no estaban completamente desarrolladas) tal y como queda reflejado en la Figura 5.1.

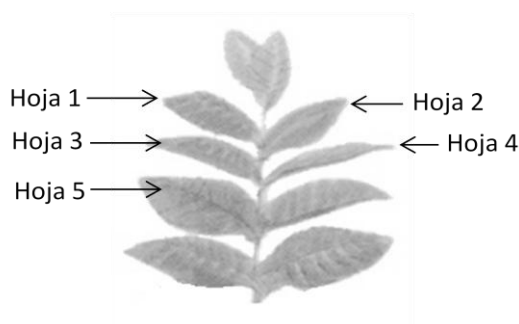


Figura 5.1: Esquematisación de las hojas seleccionadas para el bombardeo.

Primera Ronda de Selección

Una vez bombardeadas las 5 hojas, se eliminó el nervio central y cada hoja fue troceada en 16 fragmentos. Los explantos verdes de cada hoja se cultivaron en 4 cajas de medio RMOP con espectinomicina, a razón de 4 explantos por caja. Los explantos crecieron en el medio a la vez que se tornaron blancos debido al antibiótico. En

algunos explantos se formaron unos pequeños callos de color verde, de los que se desarrollaron brotes (Figura 5.2).



Figura 5.2: Brote regenerante en desarrollo a partir del explanto clorótico.

El primer brote regenerante se generó a partir de un explanto de la 3ª hoja a los 31 días después del bombardeo, el 2º brote a los 34 días; a los 44 días se contaban 7 brotes, y a los 51 días se obtuvo un número final de 10 brotes (Tabla 5.1).

Tabla 5.1: Brotes regenerantes obtenidos en la 1ª ronda de selección del bombardeo con el vector pAF PpsbA NTRC.

Número de Hoja	Número de Brotes Regenerantes	Líneas Pasadas a la 2ª Ronda de Selección
1	1	141
2	3	211
3	2	341
4	2	421, 441
5	2	511
Total	10	6

El número de brotes regenerantes obtenidos por hoja bombardeada es bastante constante. En todas las hojas se obtuvieron 2 regenerantes a excepción de la hoja número 2 con 3 regenerantes y la hoja número 1 con un solo regenerante.

La nomenclatura de los regenerantes se clasificó con un código de 3 dígitos, atendiendo éstos al número de hoja, el número de caja y el número de explanto respectivamente (Tabla 5.1).

Segunda Ronda de Selección

De los 10 brotes obtenidos en la 1ª ronda de selección, 4 se descartaron por ser totalmente cloróticos o por necrosis y muerte prematura, únicamente 6 pasaron a la 2ª ronda de selección (líneas 141, 211, 341, 421, 441 y 511). Los brotes de algunas de estas líneas mostraban un aspecto vitrificado (líneas 211 y 441) o una ligera clorosis (línea 421).

El paso a la 2ª ronda de selección consiste en aislar las pequeñas hojas de los brotes regenerantes, trocearlas y cultivar los pequeños explantos en medio RMOP con espectinomicina. Esta segunda ronda de selección se realiza para lograr la homoplasma, ya que antes de desarrollarse nuevos brotes se produce una fase de callogénesis.

En todos los explantos el callo indiferenciado estaba formado a los 15 o 16 días, y entre los 23 y 28 días tras el comienzo de la 2ª ronda de selección se obtuvieron brotes de las 6 líneas.

En la medida de lo posible se intentó repicar al medio P3 con espectinomicina (enraizamiento) 3 brotes de cada línea. No obstante, no en todos los casos se pudo llevar a cabo debido a la insuficiencia de brotes o la mala calidad de los mismos. Finalmente se obtuvieron 3 brotes (*a*, *b*, *c*) de las líneas 141, 341, 441 y 511 y únicamente 2 brotes (*a*, *b*) de las líneas 211 y 421 (Figura 5.5).

Análisis de Southern Blot

En el análisis de Southern Blot de los regenerantes obtenidos se ha utilizado la enzima de restricción BglII y una sonda que abarca parte de las secuencias flanqueantes de recombinación homóloga *trnI-trnA*.

El plastoma no transformado (*Wild Type*) muestra (en estas condiciones) un fragmento de 4,5kb (Figura 5.3), mientras que el plastoma transformado muestra dos fragmentos de 5,3 kb y 2,3 kb, debido a que la enzima BglII corta en la secuencia del promotor *PpsbA* (Figura 5.4).

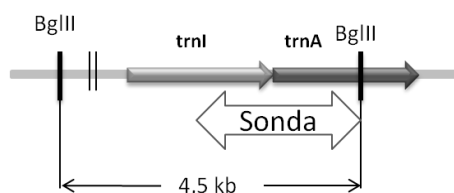


Figura 5.3: Mapa del genoma plastidial no transformado.

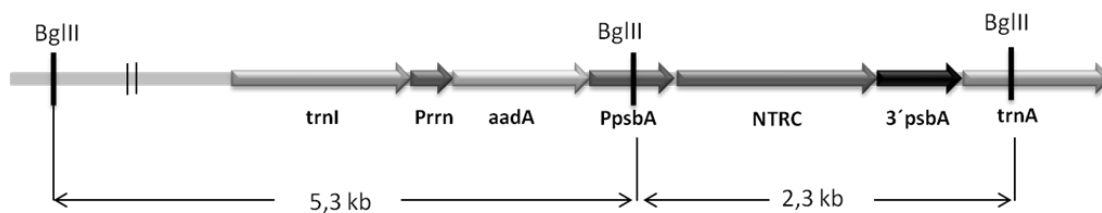


Figura 5.4: Mapa del genoma de los plastidios transformados con el vector pAF PpsbA NTRC.

La Figura 5.5 muestra el análisis de Southern Blot de los 2-3 brotes de cada una de las 6 líneas regenerantes, además de una muestra de la variedad no transformada (PH) como control negativo.

El tamaño de las bandas se puede cuantificar gracias al marcador de peso molecular (M).

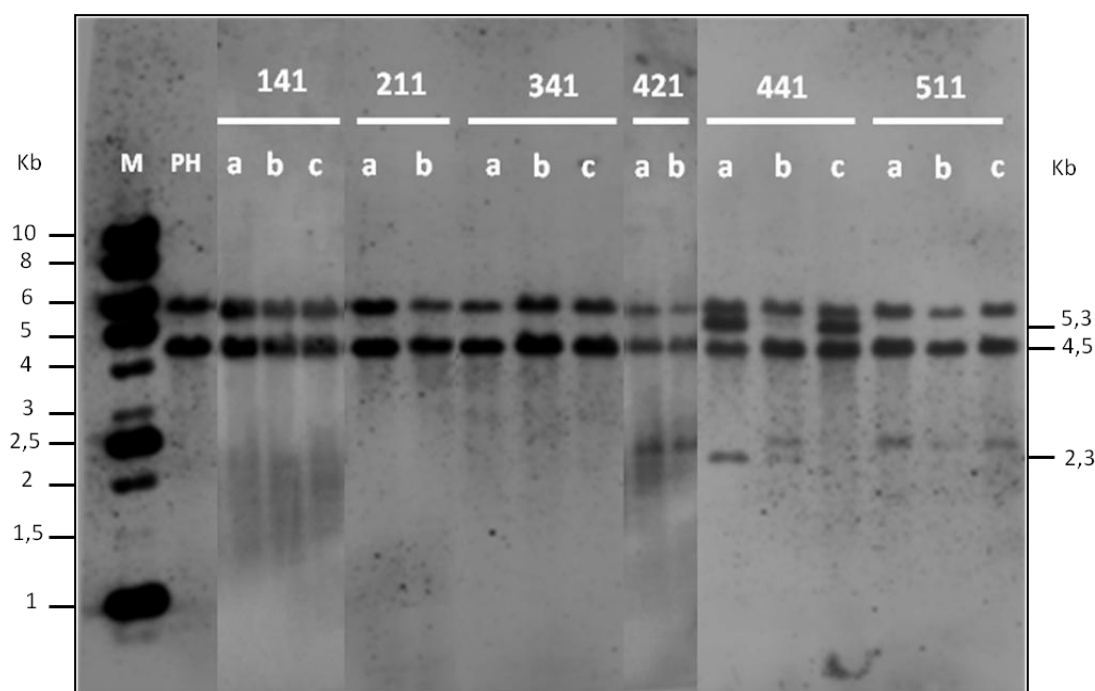


Figura 5.5: Análisis Southern Blot de los regenerantes obtenidos del bombardeo con el vector pAF PpsbA NTRC.

El análisis del control, revela dos bandas: una de 4,5kb que corresponde a la secuencia del plastoma y otra banda inespecífica próxima a los 5,5 kb. Esta última banda es inespecífica porque aparece en todas las muestras, y su origen podría ser plastómico o nuclear.

Analizando las líneas regenerantes, se puede apreciar que sólo una ha resultado ser transformante (línea 441). El brote “a” de esta línea presenta las dos bandas indicativas del plastoma transformado (2,3 y 5,3 kb), pero presenta también la banda del plastoma no transformado (4,5kb). De este modo, cabe deducir que no se ha alcanzado la homoplasma en la segunda ronda de selección y que este brote es heteroplásmico. Este estado heteroplásmico se ha podido observar a nivel fenotípico en un variegado en la hoja de la planta adulta (Figura 5.8). Los otros brotes de la misma línea presentan un patrón de bandas más complejo. Ambas presentan la banda

del plastoma no transformado y una sola banda de los plastomas transformados. El brote “b” presenta la banda de 2,3kb y el brote “c” la de 5,3kb (Figura 5.5).

En las 5 líneas regenerantes restantes no hay bandas características de los plastomas transformados. La única presencia de las bandas correspondientes al control denota que son líneas no transformadas que han sido capaces de crecer en presencia de espectinomicina sin ser portadoras del gen de resistencia *aadA*. Son por lo tanto líneas mutantes espontáneas resistentes a espectinomicina.

2. Bombardeo con el Vector pAF PrnG10L NTRC

El segundo disparo, con el vector pAF PrnG10L NTRC se realizó el día 29 de marzo del 2011. A diferencia del primer bombardeo, las hojas utilizadas procedían de diferentes plantas y mostraban un mismo estado de desarrollo (recolectadas del tercio superior de la planta).

Primera Ronda de Selección

El proceso seguido y la nomenclatura utilizada fueron idénticos a los del bombardeo con el vector pAF PpsabA NTRC.

El primer brote regenerante se desarrolló a los 34 días tras bombardear, 4 días después se contaban 8 brotes, y a los 51 días se habían obtenido un total de 14 brotes (Tabla 5.2).

Tabla 5.2: Brotes regenerantes obtenidos en la 1ª ronda de selección del bombardeo con el vector pAF prnG10L NTRC.

Número de Hoja	Número de Brotes Regenerantes	Líneas Pasadas a la 2ª Ronda de Selección
1	4	121, 141
2	0	
3	5	321, 341
4	3	441
5	2	541
Total	14	6

El máximo número de brotes regenerantes se dio en la hoja número 3, con un total de 5; mientras que la hoja número 2 no produjo ningún brote.

Segunda Ronda de Selección

De los 14 brotes regenerantes obtenidos en la primera ronda de selección, solo se pasaron 6 a la segunda ronda (líneas 121, 141, 321, 341, 441 y 541); (Tabla 5.2). Algunos de estos brotes mostraban un aspecto vitrificado (líneas 121 y 141), los demás brotes no mostraban ningún tipo de alteración fisiológica.

A los 17 días de iniciarse la segunda ronda de selección, los explantos mostraban una callogénesis incipiente. De la diferenciación celular de estos callos, surgieron los primeros brotes a los 23 días del inicio de la segunda ronda de selección.

Posteriormente se repicaron a medio de enraizamiento P3 con espectinomicina 3 brotes de las líneas 341 y 441 y 2 de las líneas 121, 141, 321 y 541.

Análisis de Southern Blot

En el análisis de Southern Blot de los regenerantes obtenidos se utilizó la misma enzima de restricción y la misma sonda que en el bombardeo con el vector pAF PpsbA NTRC. Por tanto, el plastoma no transformado muestra en el análisis el fragmento de 4,5kb (Figura 5.3). Sin embargo, el plastoma transformado presenta un fragmento de 7,4kb (Figura 5.6).

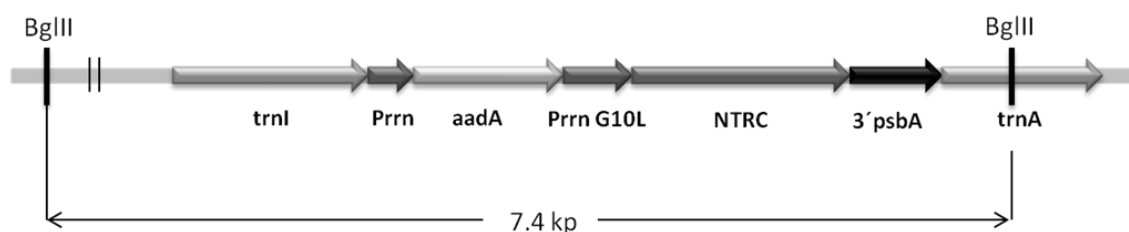


Figura 5.6: Mapa del genoma de los plastidios transformados con el vector pAF PrnG10L NTRC.

La Figura 5.7 muestra el análisis de Southern Blot de los 2-3 brotes de cada una de las 6 líneas regenerantes, además de una muestra de la variedad no transformada (PH) como control negativo. En el control se puede apreciar la banda de 4,5kb así como la banda inespecífica de mayor tamaño que aparece también en el resto de muestras.

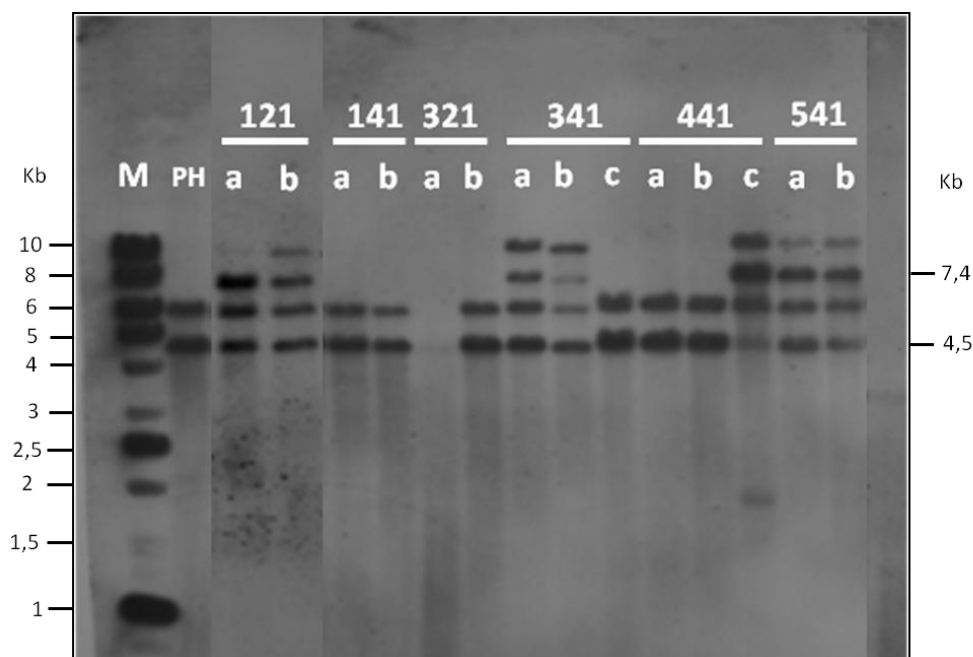


Figura 5.7: Análisis Southern Blot de los regenerantes obtenidos del bombardeo con el vector pAF PrnG10L NTRC.

De las 6 líneas regenerantes analizadas, 4 de ellas resultaron transformantes (líneas 121, 341, 441 y 541). Estas líneas muestran la banda de 7,4kb correspondiente a la inserción del transgen, además de una banda inespecífica de mayor tamaño. Todas las líneas transformantes han resultado ser heteroplásmicas, ya que tienen también la banda “*Wild Type*” de 4,5kb (Figura 5.7).

En las líneas 121 y 541, las dos muestras (*a* y *b*) han resultado ser heteroplásmicas y se puede observar un fenotipo variegado en hojas de planta adulta (Figura 5.8). Sin embargo, en las líneas 341 y 441 no todas las muestras presentan el mismo patrón de bandas. En la línea 341, las muestras “*a*” y “*b*” son transplastómicas, no así la “*c*”, mientras que en la línea 441, ha resultado transformante la línea “*c*” y no las líneas “*a*” y “*b*”. Este hecho podría ser debido a una segregación de plastomas “*Wild Type*” y

transformados durante la segunda ronda de selección, o a una confusión en el manejo de las muestras.

El resto de líneas (líneas 141 y 321) resultaron ser escapes, es decir, mutantes espontáneos resistentes a espectinomicina. En la línea 321 solo se pudo analizar la muestra “b”, porque la concentración de ADN de la muestra “a” fue insuficiente.

g

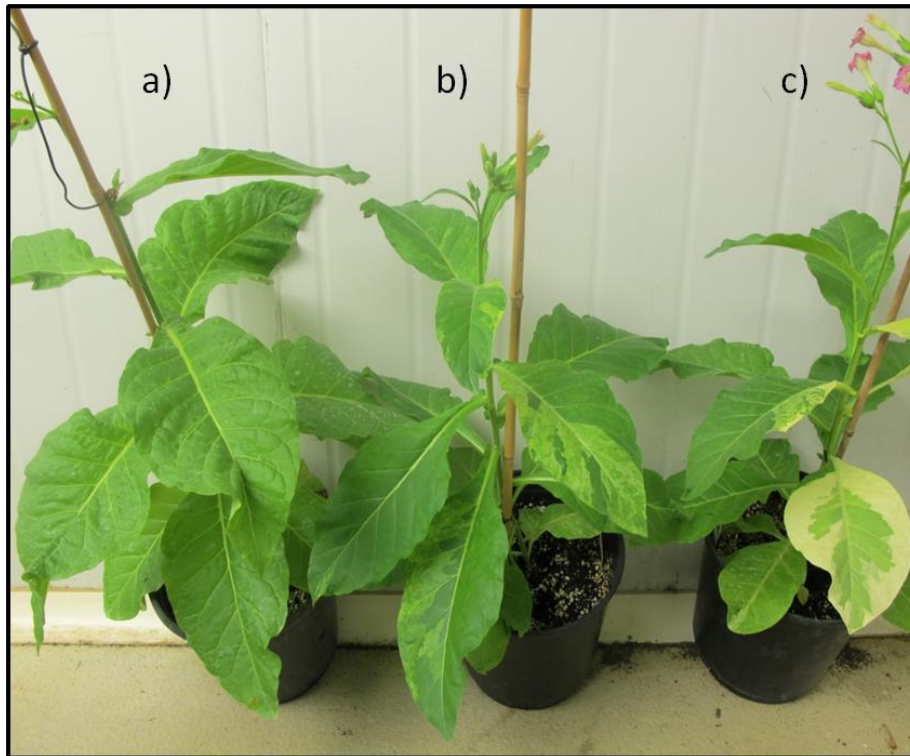


Figura 5.8: Plantas adultas. a) Control; b) Tabaco transformado con el vector pAF PrnG10L NTRC (línea 121 “a”) y c) Tabaco transformada con el vector pAF PpsbA NTRC (línea 441 “a”).

DISCUSIÓN

1. Obtención de Regenerantes

En este trabajo se han obtenido plantas transplastómicas de tabaco (cv. Petite Havana) mediante el método biolístico. Para ello se han utilizado dos vectores diferentes que comparten el marcador de selección (*aadA*) y el transgén (NTRC), y difieren en el promotor que regula el transgén. Uno de los vectores tiene el promotor fotoinducible del gen *psbA* (vector pAF PpsbA NTRC) y el otro el promotor constitutivo del gen 16S ribosomal (vector pAF Prn G10L NTRC).

En los bombardeos con ambos vectores se han obtenido regenerantes en primera ronda de selección aproximadamente entre los 30 y 50 días después del bombardeo. Estos plazos de tiempo concuerdan con los mostrados en otros trabajos con la misma variedad de tabaco, entre 3 y 8 semanas (Svab & Maliga, 1993; DeGray et al., 2001).

Comparando los resultados de los dos bombardeos se puede observar que con el vector pAF Prn G10L NTRC se han obtenido más brotes regenerantes en primera ronda de selección (14 brotes) que con el vector pAF PpsbA NTRC (10 brotes). Estos resultados coinciden con el hecho de que para el bombardeo con el vector pAF Prn G10L NTRC se utilizaron hojas en su estadio óptimo para ser bombardeadas, mientras que en el bombardeo con el otro vector se dispararon hojas de diferentes edades de una misma planta. Sin embargo, la distribución de regenerantes entre hojas bombardeadas fue más irregular en el bombardeo con el vector pAF Prn G10L NTRC; en el cual el estado fisiológico de las hojas utilizadas había sido más homogéneo.

Algunos de los brotes regenerantes en la primera ronda de selección presentaron un aspecto vitrificado (líneas 211 y 441 en el bombardeo con el vector pAF PpsbA NTRC y líneas 121 y 141 en el bombardeo con el vector pAF Prn G10L NTRC), mientras que el resto mostraron un fenotipo normal. No obstante, el hecho de que un brote mostrara o no un aspecto vitrificado no presentó posteriormente relación con la condición de ser línea transplastómica o escape.

Tras una segunda ronda de selección, el número de líneas que resultaron transformantes también fue mayor en el caso del vector pAF Prn G10L NTRC (4 líneas) que en el caso del vector pAF PpsbA NTRC (1 línea). En cualquiera de los dos casos, la

frecuencia de transformación ha resultado menor a una línea por hoja bombardeada. Frecuencias de este orden se obtenían en las primeras transformaciones plastidiales de tabaco (Zoubenko et al., 1994), pero en la actualidad se obtienen frecuencias muy superiores (Ruhlman et al., 2007). Por tanto, las frecuencias de transformación obtenidas en este trabajo pueden considerarse bajas.

2. Mutaciones Espontáneas

La espectinomicina inhibe la acumulación de clorofila y la formación de brotes cuando se usa en el medio de regeneración. Por ello las líneas con transplastomas que poseen el gen de resistencia tienen la capacidad de regenerarse y formar brotes verdes, mientras que las que son sensibles al antibiótico carecen de cloroplastos, lo que les causa la muerte. Esto hace que el gen *aadA*, que confiere resistencia a la espectinomicina, pueda utilizarse como marcador de selección en la obtención de plantas transplastómicas.

Sin embargo, en este trabajo se han obtenido líneas regenerantes en medio selectivo no transformadas, por lo tanto, carentes del gen de resistencia *aadA*. Concretamente, de las 12 líneas regenerantes obtenidas en los dos bombardeos, 7 resultaron ser no transplastómicas (5 líneas del bombardeo con el vector pAF PpsbA NTRC y 2 líneas del bombardeo con el vector pAF PrnG10L NTRC).

Estas líneas son mutantes resistentes a la espectinomicina. Esta resistencia se debe a dos mutaciones conjuntas y espontáneas en dos zonas del gen *rrn16* que codifica el 16S ARNr en el cloroplasto. Las mutaciones en la región 3'UTR del 16S ARNr coinciden posicionalmente en plantas mutadas y resistentes de *Nicotiana tabacum* y *Lesquerella fendleri* (Filipenko et. al., 2011). Estas mutaciones se dan durante la callogénesis del explanto en presencia de espectinomicina como agente selectivo de las células transplastomáticas y es común en *Arabidopsis* (Sikdar et al., 1998), patata (Sidorov et. al., 1999), tabaco (¹Svab Z et. al., 1990; ²Svab Z et. al., 1990) y *Lesquerella fendlerii* (Skarjinskaia M. et. al., 2003).

3. Heteroplasma

Se distinguen dos niveles de heteroplasma (Bock, 2001): i) la heteroplasma interplastídica, en la que en una misma célula conviven cloroplastos con genomas nativos y cloroplastos transformados, y ii) la heteroplasma intraplastídica, en la que simultáneamente en un plastidio hay genomas modificados y sin modificar.

En ambos tipos de heteroplasma, los diferentes alelos son segregados durante la mitosis en las divisiones celulares. La segregación de los plastomas se demostró en 1978 con cruzamientos entre geranios con cloroplastos verdes y geranios con cloroplastos blancos mutados. Las plantas jóvenes desarrolladas a partir de un cigoto biparental poseían células mixtas con ambos tipos de cloroplastos, pero al alcanzar la madurez, las plantas tenían células que tendían a la homoplasma. Por ello se sabe que el carácter heteroplástico de las células es muy inestable y se tiende a la rápida segregación de dos genomas (Johnson et al., 1989). No obstante, existen limitaciones para alcanzar la homoplasma en la transformación plastidial, como es el alto grado de ploidía del ADNpt (cerca de 10.000 copias por célula) y el hecho de que el tiempo de selección se incrementa conforme se va alcanzando la homoplasma (Maliga, 2004). Por ello, es necesario realizar diferentes rondas de selección.

En este trabajo fin de carrera todos los regenerantes transplastómicos obtenidos tras una segunda ronda de selección fueron heteroplásticos, y con el desarrollo de las plantas en maceta se ha podido diferenciar el fenotipo variegado en hoja de los mismos (Figura 5.8). Debido a que el tabaco es una especie en la que la homoplasma se alcanza con relativa facilidad (Koop et al., 2007), los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que la sobreexpresión del transgén NTRC podría presentar efectos perjudiciales para la planta, favoreciendo de este modo la heteroplasma.

En la bibliografía se han documentado múltiples casos en los cuales no se ha podido obtener regenerantes homoplásticos después de la segunda ronda de selección, y para lograr la homoplasma se ha tenido que recurrir a rondas adicionales de selección (Iamtham & Day, 2000; Ye et al., 2001; Zhou et al., 2008; Oey et al., 2009), cruzamientos (DeGray et al., 2001) o germinación de semillas en medios selectivos.

CONCLUSIONES

1. Se han obtenido plantas transplastómicas de tabaco sobreexpresando el gen NTRC bajo el control tanto del promotor fotoinducible *PpsbA* como del promotor constitutivo *Prrn*.
2. La frecuencia de transformación ha sido baja (menos de una línea transplastómica por hoja bombardeada) con los dos vectores utilizados.
3. La totalidad de las líneas transformantes han resultado heteroplásmicas tras una segunda ronda de selección, lo que podría indicar un efecto negativo de la sobreexpresión del gen NTRC en tabaco.
4. Se han obtenido más líneas transformadas empleando el vector del promotor *Prrn* en cuyo bombardeo se habían utilizado hojas más jóvenes.
5. No se ha encontrado relación entre el empleo de explantos con o sin aspecto vitrificado en la segunda ronda de selección y la obtención de líneas transformantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P (2005).** Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*. 15, 305–327.
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F (2010).** Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. 22, 1498–1515.
- Baulcombe D (2004).** RNA silencing in plants. *Nature*. 431, 356-63.
- Bendich AJ (1987).** Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome. *BioEssays*. 6, 279-282.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983).** A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*. 304, 184–187.
- Bhattacharyya S, Habibi-Nazhad B, Amegbey G, Slupsky CM, Yee A, Arrowsmith C, Wishart DS (2002).** Identification of a novel archaeobacterial thioredoxin: determination of function through structure. *Biochemistry*. 41(15), 4760-4770.
- Bock (2001).** Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312, 425-438.
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988).** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*. 240, 1534–1538.
- Brooks S (2004).** Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. *Molecular Biotechnology*. 28(3), 241-255.
- Buchanan B (1991).** Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system: perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 1–9.
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P. (1993).** Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 241(1-2), 49-56.

- Cheng L, Li HP, Qu B, Huang T, Tu JX, Fu TD, Liao YC (2010).** Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. *Plant Cell Rep.* 29, 371–381.
- Chiyoda, S, Linley PJ, Yamato KT, Fukuzawa H, Yokota A, Kohchi T (2007).** Simple and efficient plastid transformation system for the liverwort *Marchantia polymorpha* L. suspension-culture cells. *Transgenic Res.* 16, 41-49.
- Cho MJ, Wong JH, Marx C, Jiang W, Lemaux P, Buchanan B (1999).** Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(25), 14641–14646.
- Clarke & Daniell (2011).** Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol. Biol.* 76(3-5), 211-220.
- Clive J (2003).** Global review of commercialized transgenic crops. *Current Science.* 84(3).
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E (2004).** Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new γ -type. *Plant Physiology.* 136, 4088–4095.
- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC & Shewmaker CK (1986).** Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 202, 179–185.
- Daniell H, Vivekananda J, Nielsen BL, Ye GN, Tewari KK, Sanford JC (1990).** Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87, 88-92.
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998).** Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology.* 16, 345–348.
- Daniell H (1999).** GM crops: public perception and scientific solutions. *Trends Plant Sci.* 4(12), 467-469.
- Daniell H (2002).** Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* 20, 581–586.
- Day A & Goldschmidt-Clermont M (2011).** The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal.* 9(5), 540-553.

- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Schell J, Zambryski P (1984).** Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *European Molecular Biological Organization Journal*. 3, 1681-1689.
- De Cosa B, MoarW, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001).** Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat. Biotechnol.* 19, 71–74.
- De Marchis F, Wang YX, Stevanato P, Arcioni S, Bellucci M (2009).** Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Res.* 18, 17–30.
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001).** Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol.* 127, 852–862.
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004).** Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol. Biol.* 55, 479-489.
- Fernández-San Millán A, Ortigosa SM, Hervás-Stubbs S, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Gaétan J, Coursaget P, Veramendi J (2008).** Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* 6(5), 427-441.
- Filipenko EA, Sidorchuk IV, Deineko EV (2011).** Spontaneous spectinomycin resistance mutations of the chloroplast rrn16 gene in *Daucus carota* callus lines. *Genetika.* 47(1), 41-47.
- Fischer R & Emans N (2000).** Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res.* 9(4-5), 279-99.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL (1983).** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 4803–4807.
- Gillham NW (1994).** Organelle genes and genomes. Oxford University Press, NY.
- Goldschmidt-Clermont M (1991).** Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res.* 19, 4083–4089.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008).** Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 491-517.

- Goulding S, Olmstead R, Morden C, Wolfe K (1996).** Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. *Mol. Gen. Genet.* 252(1-2), 195–206.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, van Montagu M, Schell J (1983).** Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature.* 303, 209–213.
- Hess WR & Börner T (1999).** Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190, 1-59.
- Hibberd, JM, Linley PJ, Khan MS, Gray JC (1998).** Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *The Plant Journal.* 16, 627–632.
- Huang C, Klaus SM, Herz S, Zou Z, Koop HU, Golds TJ (2002).** Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection. *Mol. Genet. Genomics.* 268, 19–27.
- Huang C, Ayliffe MA, Timmis JN (2003).** Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature.* 422, 72–76.
- Iamtham S & Day A (2000).** Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnol.* 18, 1172–1176.
- Jacquot J, Lancelin J, Meyer Y (1997).** Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytologist.* 136(4), 543-570.
- Jin S, Kanagaraj A, Verma D, Lange T, Daniell H (2011).** Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of B-glucosidase results in elevated phytohormone levels with significant increase in biomass and protection from aphids and whiteflies conferred by sucrose esters. *Plant Physiol.* 155, 222–235.
- Johnson T, Cao R, Kung J, Buchanan B (1987).** Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta.* 171, 321-331.
- Johnson, Lowell B, Palmer, Jeffrey D (1989).** Heteroplasmy of chloroplast DNA in *Medicago*. *Plant Molecular Biology.* 12(1), 3-11.
- Park J, McFarlane I, Phipps R, Ceddia G (2011).** The impact of the EU regulatory constraint of transgenic crops on farm income. *New Biotechnology.* 28(4), 396-406.

- Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K (2006).** Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res.* 15, 205-217.
- Kavanagh A, Nguyen D, Lao NT, Noreen M, Peter SO, Horvath EM, Dix PJ, Medgyesy P (1999).** Homeologous Plastid DNA Transformation in Tobacco Is Mediated by Multiple Recombination Events. *Genetics.* 152, 1111–1122.
- Kim & Mullet (1994).** Ribosome-binding sites on chloroplast *rbcl* and *psbA* mRNAs and lightinduced initiation of D1 translation. *Plant Mol. Biol.* 25, 437–448.
- Knäblein J & Schering AG (2005).** Plant-based Expression of Biopharmaceuticals. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine.* 10, 386-407.
- Koop HU, Herz S, Golds TJ, Nickelsen J (2007).** The genetic transformation of plastids. *Topics in Current Genetics.* 19, 457-510.
- ¹Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004).** Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136, 2843-2854.
- ²Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004).** Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol. Biol.* 56, 203-216.
- Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL, Staub JM (2004).** High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 135(1):39-46.
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han S, Daniell H (2003).** Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breeding.* 11, 1–13.
- Lee SB, Li B, Jin S, Daniell H (2011).** Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol. J.* 9, 100–115.
- Lehmeier B & Amann E (1992).** Tac promoter vectors incorporating the bacteriophage T7 gene 10 translational enhancer sequence for improved expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 23 (2), 153-163.
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis- Bourguet E (2007).** Thioredoxins in chloroplasts. *Curent Genetics.* 51, 343–365.

- Liu CW, Lin CC, Chen JJ, Tseng MJ (2007).** Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 26, 1733-1744.
- Maliga P (2004).** Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 289-313.
- Marín-Navarro J, Manuell AL, Wu J, Mayfield SP (2007).** Chloroplast translation regulation. *Photosynthesis Res.* 94, 359-374.
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995).** Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio. Technology.* 13, 362–365.
- Mestres-Ortega D & Meyer Y (1999).** The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene.* 240(2), 307-16.
- Mittler R (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Murai N, Kemp JD, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Kemp JD, Hall TC (1983).** Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222, 476–482.
- Negrutiu I, Shillito RD, Potrykus I, Biasini G, Sala F (1987).** Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. *Plant Mol. Biol.* 8(5), 363–373.
- Obembe O, Popoola J, Leelavathi S, Reddy S (2010).** Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* 29(2), 210-22.
- Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R (2009).** Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J.* 57(3), 436-45.
- Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K (2006).** Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res.* 15, 637-646.
- Park J, McFarlane I, Phipps R, Ceddia G (2011).** The impact of the EU regulatory constraint of transgenic crops on farm income. *New Biotechnology.* 28(4), 396-406.

- Pérez-Ruiz JM, Spínola M C, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ (2006).** Rice NTRC Is a High-Efficiency Redox System for Chloroplast Protection against Oxidative Damage. *The Plant Cell*. 18, 2356–2368.
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001).** Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat. Biotechnol.* 19, 870-875.
- Ruhlman T, Ahangari R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007).** Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts—oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol. J.* 5(4), 495-510.
- Ruiz ON, Hussein H, Terry N, Daniell H (2003).** Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol.* 132, 1344–1352.
- Sanford J, Klein T, Wolf E, Allen N (1987).** Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.* 5, 27-37.
- Sanford J (1988).** The biolistic process. *Trends in Biotechnology.* 6, 299-302.
- ¹Sanz-Barrio, Fernández-San Millán, Corral-Martínez, Seguí Simarro, Farran (2011).** Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant Biotechnology J.* 9(6), 639-650.
- ²Sanz-Barrio, Millán, Carballada, Corral-Martíne, Seguí-Simarro, Farran (2011).** Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/err282.
- Sarwar & Maliga (1999).** Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature Biotechnology.* 17, 910 – 915.
- Schürmanna & Wolosiukb (1978).** Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 522, 130-138.
- Schürmann P & Jacquot JP (2000).** Plant thioredoxin systems revisited. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 371-400.
- Schürmann P & Buchanan BB (2008).** The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal.* 10(7), 1235-74.
- Serino G & Maliga P (1997).** A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *The Plant Journal.* 12, 697–701.

- Serrato JA, Pérez-Ruiz JM, Spínola M, Cejudo F J (2004).** A Novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *The journal of biological chemistry*. 279(42), 43821–43827.
- Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985).** High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio. Technology*. 3, 1099–1103.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986).** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast: its gene organization and expression. *EMBO J*. 5(9), 2043–2049.
- Sidkar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998).** Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*. 18, 20–24.
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999).** Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*. 19, 209–16.
- Singh AK, Verma SS, Bansal KC (2010).** Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res*. 19, 113–119.
- Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003).** Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res*. 12, 115–22.
- Suske G, Wagner W, Follmann H (1979).** NADP-dependent thioredoxin reductase and a new thioredoxin from wheat. *Z. Naturforsch*. 34, 214–21.
- ¹**Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990).** Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 8526–8530.
- ²**Svab Z, Harper EC, Jones JD, Maliga P (1990).** Aminoglycoside-3-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol*. 14, 197–205.
- Svab Z & Maliga P (1993).** High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 913–917.

- Svab Z & Maliga P (2007).** Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 7003–7008.
- Taylor NJ & Fauquet CM (2002).** Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology.* 21, 963-977.
- Tungsuchat-Huang T, Slivinski KM, Sinagawa-Garcia SR, Maliga P (2010).** Visual spectinomycin resistance (aadA(au)) gene for facile identification of transplastomic sectors in tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 76(3-5), 453-61.
- Vandenabeele S, Van der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Bonefaes T, Morsa S, Rttiers P, Sloten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inzé D, Van Breusegem F (2003).** A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 16113–16118.
- Verma & Daniell (2007).** Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications. *Plant Physiology.* 145, 1129–1143.
- Verma D, Samson NP, Koya V, Daniell H (2008).** A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat. Protoc.* 3, 739–758.
- Wakasagi, Sugita, Sudzuki, Sugiura (1998).** Updated Gene Map of Tobacco Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter.* 16, 231–241.
- Warzecha (2010).** Plastid Transformation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 64, 23-37.
- Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM (2001).** Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J.* 25(3), 261-70.
- Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers AM, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R. (2008).** High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol. J.* 6(9), 897-913.
- Zoubenko OV, Allison LA, Svab Z, Maliga P (1994).** Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Res.* 22, 3819–3824.
- Zubkot MK, Zubkot EI, van Zuilen K, Meyer P, Day A (2004).** Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res.* 13(6), 523-30.

PÁGINAS WEB

www.biorad.com: Página oficial de la empresa Bio Rad®